

TESIS

**PENGARUH POLIFENOL TEH HIJAU
TERHADAP RESPON ALERGI PADA MENCIT BALB/c
YANG DISENSITISASI OVALBUMIN**

*(THE INFLUENCE OF GREEN TEA POLYPHENOL IN THE ALLERGIC RESPONSE
ON BALB/c MICE SENSITIZED BY OVALBUMIN)*



TESIS

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan
Mencapai derajat S2**

Magister Ilmu Biomedik

**Henny Kartikawati. D
G4A000006**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
MARET
2003**

i

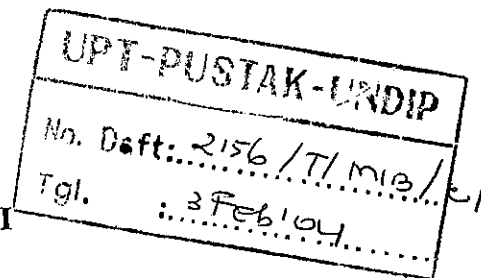
UPT-PUSTAK-UNBIP

HALAMAN PENGESAHAN

**PENGARUH POLIFENOL TEH HIJAU
TERHADAP RESPON ALERGI PADA MENCIT Balb/C
YANG DISENSITISASI OVALBUMIN**

Disusun oleh :

HENNY KARTIKAWATI
G4A000006



Disetujui untuk diajukan pada

Ujian Tesis

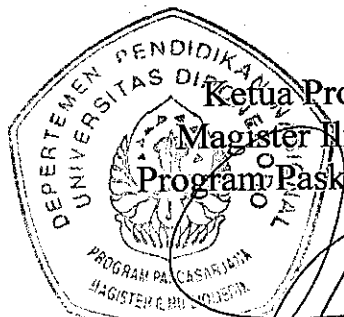
Tanggal 25 Juni 2003

Pembimbing Utama

(dr. Edi Dharmana, MSc, PhD)
NIP 130 529 451

Pembimbing Kedua

(dr. Andrew Johan, Msi)
NIP 131 673 427



Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik
Program Paska Sarjana Undip

Prof. dr. H. Soebowo, Sp.PA
NIP. 130 352 549

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir pada tanggal 28 Maret 1970 di Kotamadia Semarang.

Riwayat pendidikan :

1. SD Don Bosco di Semarang lulus th 1983
2. SMP Domenico Savio di Semarang lulus 1985
3. SMAN 3 di Semarang lulus 1988
4. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro di Semarang, lulus tahun 1995.
5. Bekerja sebagai dokter PTT pada th 1995 s/d1998 di Rumah Sakit Jiwa Magelang dan di Balai Kesehatan Mata Masyarakat (BKMM) Jawa Tengah di Semarang.
6. Bekerja sebagai staf pengajar di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan mata kuliah Parasitologi sejak tahun 1999.
7. Melanjutkan kuliah di program studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang mulai tahun 2000.

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, karena berkat rahmatnya tesis ini bisa diselesaikan. Tesis tersusun berkat bantuan, dorongan, bimbingan dari berbagai pihak baik berupa moril maupun materiil. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada yang terhormat

1. dr. Edi Dharmana MSc, Phd selaku pembimbing I dan dr. Andrew Johan Msi selaku pembimbing II yang senantiasa memberikan dorongan moril agar terus maju dan cepat menyelesaikan studi. Banyak pemikiran beliau yang membuka cakrawala baru terhadap penulis dalam bidang imunologi.
2. Rektor Universitas Diponegoro yang memberikan kesempatan pada staf pengajar UNDIP untuk melanjutkan studi.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang memberikan kesempatan pada staf pengajar UNDIP untuk melanjutkan studi.
4. Kepala Laboratorium Bioteknologi Universitas Diponegoro yang telah memberikan tempat, fasilitas dan tenaga yang sangat membantu penelitian ini.
5. drh. Wayan T Artama, Phd. yang telah memberikan tempat dan fasilitas laboratorium Bioteknologi Universitas Gajah Mada untuk penelitian ini.
6. Bapak Jamal dan Nona Nata yang banyak membantu dan penuh suka cita menjalankan tugasnya memperlancar segala proses administrasi pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik UNDIP ini.
7. Bapak Dukut dan Bapak Ngatimin yang sangat membantu dalam proses pelaksanaan penelitian dalam pemeliharaan hewan coba dan dalam pengambilan sampel.

8. Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro yang membuka peluang kepada siapa saja yang memenuhi persyaratan untuk meningkatkan ilmu pengetahuan dan darma baktinya bagi bangsa dan negara.
9. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Prof. Dr. Soebowo, SpPA yang senantiasa mengingatkan kami untuk cepat menyelesaikan studi S2 ini.
10. Ibu yang senantiasa memanjatkan doa dan restunya
11. Nanang Yustanto, Farkhanda Rahardian dan Irfan M. Adriansyah (suami dan anak-anakku) tersayang yang dengan penuh keikhlasan dan pengertian selalu memberikan kesempatan dan semangat untuk terus maju.
12. Rekan-rekan staf pengajar mata kuliah Parasitologi FK UNDIP
13. Rekan-rekan senasib seperjuangan yang merupakan angkatan tahun 2000 Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro.
14. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT melimpahkan berkat dan rahmatNya kepada semua pihak yang telah banyak membantu. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi dunia pendidikan dan masyarakat luas serta dapat menambah pengetahuan bagi yang membutuhkannya.

Kami menyadari bahwa tesis ini jauh dari kesempurnaan dengan demikian saran dan kritik yang membangun sangat kami harapkan demi kemajuan dan pengembangan keilmuan kami.

Semarang, 2003

Penulis,

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang / tidak diterbitkan , sumbernya dijelaskan didalam tulisan dan daftar pustaka

Semarang , Juli 2003

(Henny Kartikawati)

DAFTAR ISI

1. Halaman Judul	i
2. Halaman Pengesahan	ii
3. Riwayat Hidup	iii
4. Kata Pengantar	iv
5. Lembar Pernyataan	vi
5. Daftar isi	vii
6. Daftar Tabel	x
7. Daftar Gambar	xi
8. Daftar Lampiran	xii
9. Abstrak	xiii
10. BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.5. Originalitas	5
11. BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. <i>Green Tea Polyphenol</i>	6
2.2. <i>Green Tea Polyphenol</i> terhadap Sistem Imun	8
2.3. Alergi	10
2.3.1. Atopi dan Sel Limfosit T Helper 2	11
2.4. Paradigma Keseimbangan Respon Imun Th1 dan Th2	13

2.5. Ovalbumin	18
2.6. Interferon gamma (IFN- γ)	20
2.6.1. Reseptor pada IFN- γ	21
2.7. Eosinofil	22
2.7.1. Tehnik Pemeriksaan Eosinofil	26
12. BAB III. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN	
 HIPOTESIS PENELITIAN	27
3.1. Kerangka Teori	27
3.2. Kerangka Konsep.....	28
3.3. Keterbatasan Penelitian	28
3.4. Hipotesis Penelitian.....	28
13. BAB IV. Metodologi Penelitian	29
4.1. Rancangan Penelitian	29
4.2. Populasi dan Sampel	30
4.2.1. Populasi	30
4.2.2. Sampel	31
4.2.2.1. Besar Sampel	31
4.2.2.2. Cara Pengambilan Sampel	31
4.3. Variabel Penelitian	32
4.3.1. Variabel Bebas	32
4.3.2. Variabel Tergantung	33
4.3.3. Variabel Antara	33
4.3.4. Definisi Operasional	34

4.4. Tempat dan Waktu Penelitian	34
4.5. Bahan dan Materi Penelitian	35
4.6. Alat/ Instrumen Penelitian	35
4.7. Prosedur Pengumpulan Data	36
4.8. Alur Kerja	37
4.9. Pemeriksaan	37
4.9.1. Pemeriksaan Hitung Jenis Eosinofil Darah Tepi	38
4.9.2. Pemeriksaan Kadar IFN gamma	40
4.10. Analisis Data	44
14. BAB V. Hasil dan Pembahasan	45
5.1. Analisis Statistik IFN- γ	45
5.1.1. Analisis Deskriptif IFN- γ	45
5.1.2. Analisis Analitik IFN- γ	47
5.1.3. Pembahasan IFN- γ	48
5.2. Analisis Statistik Hitung Jenis Eosinofil	51
5.2.1. Analisis Deskriptif Hitung Jenis Eosinofil	51
5.2.2. Analisis Analitik Hitung Jenis Eosinofil	53
5.2.3. Pembahasan Eosinofil	53
15. BAB VI. Simpulan dan Saran	56
16. BAB VII. Ringkasan	58
17. DAFTAR PUSTAKA	60
18. LAMPIRAN	65

DAFTAR TABEL

No	Halaman
1. Perhitungan dosis Green Tea Polyphenol	32
2. Analisis Deskriptif Kadar IFN- γ pada kelompok perlakuan	46
3. Hasil uji LSD terhadap kadar IFN- γ pada kelompok perlakuan.....	47
4. Analisis Deskriptif Hitung Jenis Eosinofil darah tepi pada kelompok perlakuan	52
5. Hasil uji beda makna antar kelompok (Uji LSD) pada hitung jenis eosinofil darah tepi	53

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Paradigma keseimbangan respon imun Th1-Th2	14
2. Grafik Boxplot dari kadar IFN- γ pada tiap kelompok perlakuan	47
3. Grafik Boxplot hitung jenis eosinofil pada tiap kelompok perlakuan.....	53

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. kurva standar dari IFN- γ kit	66
2. kadar IFN- γ	67
3. Hitung Jenis Eosinofil	67
4. Master Tabel	72
5. Hasil Print Out Elisa Rader untuk OD IFN- γ	73

THE INFLUENCE OF GREEN TEA POLYPHENOL IN THE ALLERGIC RESPONSE ON BALB/c MICE SENSITIZED BY OVALBUMIN

ABSTRACT

Initiation of the wrong response can lead allergy becoming severe and, in some cases, death. Atopy is characterized by an immune system that is biased to T helper cell, type 2. Atopy was characterized by a higher production of IL-4, which is correlated to total IgE levels, and by an impairment of the T-cell capacity to produce IFN- γ . The identification of distinct subsets in mouse CD4⁺ T cell clones divided into two subsets Th1 and Th2 clones, that various factors can affect skewing immune responses on Th1- or Th2 activation as we expected.

The objective of this study was to investigate the effect of Green Tea Polyphenol/ GTP on reduce allergy response in BALB/c mice sensitized with ovalbumin. Green Tea Polyphenol have the capacity on initiating Th1 immune response, which identified by the increasing of IFN- γ production. We used GTP to skew the pro allergic immune response becoming cellular immune response, by IFN- γ production and differential blood counting on eosinophil as indicators. Balb/C mice were immunized by an intraperitoneal injection of 10 ug ovalbumin in 100 ug Alum Adjuvant on day 1 and day 14, and then Balb/C mice becoming Th2-mediated allergic immune responses.

The result did not differ between the sensitized group which's given GTP and another group which's not given GTP, observed on IFN- γ production and eosinophil differential blood counting. We therefore conclude although GTP increasing IFN- γ production and decreasing the eosinophil differential blood count but the interfere of IL-10 production could prevent the optimal changes of IFN- γ and blood eosinophilia. Duration and daily dose of GTP administration did not adequate to suppress allergic response.

Avoiding over-sterilized life style becoming good reason in controle the prevalence of Allergic diseases. Indonesia as unsterilized environment naturally prevent the citizen becoming an allergenic person.

Key words : Green Tea Polyphenol, allergy response, Interferon gamma, eosinophil

PENGARUH POLIFENOL TEH HIJAU TERHADAP RESPON ALERGI PADA MENCIT BALB/c YANG DISENSITISASI OVALBUMIN

ABSTRAK

Pada Alergi pemberian terapi yang salah bisa mengakibatkan penderita semakin parah, bahkan dalam beberapa kasus mengakibatkan kematian. Atopy biasanya diiringi dengan sistem imun yang condong ke aktivasi sel limfosit Th2, yang ditandai dengan peningkatan produksi IL-4 yang terkait dengan IgE, dan kegagalan sel T dalam kapasitasnya memproduksi IFN- γ . Identifikasi sel T CD4+ pada mencit terdiri dari 2 subset yaitu subset Th2 dan subset Th2, menyebutkan bahwa berbagai faktor dapat memberikan efek dalam rangka menggeser keseimbangan Th1-Th2 sesuai yang kita harapkan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh dari Polifenol Teh Hijau/ *Green Tea Polyphenol/ GTP* dalam memperbaiki respon alergi pada mencit yang disensitisasi dengan ovalbumin. *GTP* memiliki kemampuan menginduksi respon imun Th1, yang ditandai dengan peningkatan produksi IFN- γ . Kami menggunakan *GTP* untuk menggeser respon imun pro alergi menjadi respon imun selular dengan memakai kadar IFN- γ dan hitung jenis eosinofil sebagai indikator. Mencit Balb/C diimunisasi dengan ovalbumin secara intra peritoneal yang mengakibatkan hewan coba memiliki respon imun pro alergi (Th2).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok yang disensitisasi ovalbumin dan diberi suplementasi *GTP* dibandingkan dengan kelompok yang hanya disensitisasi dengan ovalbumin, dilihat dari kadar IFN- γ dan hitung jenis eosinofil. Sehingga kami menyimpulkan bahwa walaupun *GTP* mampu meningkatkan kadar IFN- γ dan menurunkan hitung jenis eosinofil darah namun karena adanya pengaruh IL-10 mengakibatkan terhambatnya peningkatan kadar IFN- γ dan terhambatnya penurunan jumlah eosinofil. Lama pemberian *GTP* yang pendek dan dosis yang kecil mengakibatkan penekan respon pro alergi masih *inadequate*.

Menghindari gaya hidup yang terlalu steril saat ini merupakan alasan yang tepat untuk mengurangi prevalensi dari penyakit-penyakit alergi. Indonesia sebagai negara dengan iklim tropis dimana terdapat banyak infeksi secara alamiah menghindarkan penduduknya menjadi manusia yang mudah terkena penyakit alergi.

Kata Kunci : *Green Tea Polyphenol, Alergi, Interferon gamma, eosinofil*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Prevalensi penyakit atopi di negara berkembang secara umum lebih rendah dibandingkan negara maju. Di negara maju seperti Inggris, Swedia, Switzerland, Amerika Serikat, Australia dan negara-negara Asia seperti Taipei, Jepang angka kejadian asma meningkat rata-rata 5 % tiap tahunnya.¹ Hal ini terjadi karena sanitasi yang lebih baik mengakibatkan paparan infeksi menjadi lebih jarang, sedangkan kemampuan sistem imun kita akan berubah ke arah respon Th1 setelah terjadi paparan infeksi bakteri atau virus yang sekaligus mengakibatkan respon imun pro alergi (Th2 akan tertekan).^{2,3}

Akhir akhir ini paradigma keseimbangan Th1-Th2 tersebut merupakan fokus penting dalam imunologi. Paradigma tersebut menjelaskan bahwa sistem imun memiliki 2 lengan yaitu respon imun Th1 yang umumnya mengatasi infeksi patogen intrasel dan respon imun Th2 mengatasi patogen ekstrasel.³ Respon imun tersebut masing-masing dikendalikan oleh sitokin yang dihasilkan sel Th1 dan sel Th2. Sel Th1 yang teraktivasi akan memproduksi IL-2, IFN- γ dan limfotoksin, akan tetapi tidak memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-10. Kebalikannya subset Th2 yang teraktivasi akan memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-10 akan tetapi tidak memproduksi IFN- γ dan IL-2 maupun limfotoksin. Berbagai bukti memperlihatkan bahwa sitokin-sitokin Th1 berperan pada imunitas seluler dan sel Th2 berperan menstimulasi sel limfosit B untuk memproduksi IgE sehingga berperan terhadap imunitas humoral dan terjadinya alergi.⁴

IFN- γ yang diproduksi oleh sel limfosit Th1 merupakan sitokin yang mengaktifkan monosit dan makrofag. IFN- γ sangat kuat dan berperan secara spesifik menghambat IL-4. Sehingga IFN- γ mampu menekan diferensiasi sel limfosit Th2 dan menekan sel B untuk tidak memproduksi Ig-E.^{3,4} Penelitian sebelumnya pernah membuktikan bahwa IFN- γ yang mendominasi respon imun, secara signifikan mampu menurunkan insiden asthma. Penelitian lain menyatakan bahwa pemberian IFN- γ atau IL-12, yang menginduksi respon imun ke arah Th1 dilaporkan bisa menekan eosinofilia pada saluran nafas dan produksi IgE pada mencit.⁵ Tingginya produksi IL-12 dan IFN- γ berperan penting dalam mengaktifkan respon imun Th1 pada mencit Balb/C, dimana pada saat yang sama jumlah IL-4 produksinya akan tertekan.⁵

Akhir-akhir ini dibuktikan bahwa polifenol teh hijau/ *Green Tea Polyphenol/ GTP* merupakan zat aktif dari teh hijau (*Camellia sinensis*) yang memiliki khasiat antioksidan, anti inflamasi dan anti kanker.^{6,7} Penelitian terdahulu memperlihatkan bahwa *Green Tea Polyphenol* mampu meningkatkan respon IL-12 dan meningkatkan produksi IFN- γ sehingga meningkatkan pula respon imun sistemik terhadap infeksi intra selular dan kanker.⁷ IFN- γ merupakan mediator supresif yang sangat kuat untuk menekan aktifitas respon imun Th2 , sehingga *GTP* diharapkan bisa menekan aktifitas respon imun pro alergi (Th2).^{3,6,7} *GTP* juga dapat menghambat pelepasan histamin dari sel mast pada tikus yang disensitisasi albumin.⁸

Peningkatan jumlah eosinofil pada sirkulasi dan sebaran eosinofil pada jaringan sangat terkait dengan penyakit alergi dan infestasi cacing. Hal ini

disebabkan karena adanya peningkatan konsentrasi dari sitokin terutama IL-5 yang beredar sehingga meningkatkan survival eosinofil dan meningkatkan kemampuan eosinofil untuk bermigrasi ke jaringan.⁹ Pada manusia yang sehat jumlah eosinofil hanya berkisar antara 2-4 % dari seluruh lekosit darah perifer. Pada pasien dengan penyakit alergi dan infeksi parasit ; eosinofil terakumulasi pada suatu jaringan tertentu diikuti dengan peningkatan jumlah eosinofil darah tepi.¹⁰

Jumlah eosinofil dapat diperiksa pada darah tepi atau pada jaringan yang terpapar alergen. Pada penelitian ini pemeriksaan jumlah eosinofil tidak dilakukan dengan sampel cairan intra peritoneal karena pada penelitian pendahuluan ternyata morfologi eosinofil tidak dapat dikenali dengan jelas, berbeda dengan perhitungan hitung jenis eosinofil dimana pengecatan menggunakan Giemsa morfologi eosinofil dapat dikenali dengan jelas.

Ovalbumin merupakan bahan yang dapat merangsang pembentukan respon imun ke arah Th2 dominan dan merupakan salah satu alergen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya reaksi hipersensitivitas tipe I pada manusia.¹¹ Ovalbumin sering dipakai sebagai bahan untuk sensitisasi respon imun mencit ke arah Th2 dominan , yang dapat diberikan secara inhalasi, oral maupun intra peritoneal dimana sensitisasi dengan ovalbumin tersebut telah dilaksanakan pada beberapa penelitian.^{12,13}

Dalam penelitian ini akan dilihat pengaruh pemberian *Green Tea Polyphenol* terhadap respon alergi pada mencit Balb/C yang disensitisasi dengan

ovalbumin secara intraperitoneal yang dilihat dari perubahan kadar interferon gamma (IFN- γ) dan perubahan hitung jenis eosinofil darah tepi.

1.2. PERUMUSAN MASALAH

Apakah pemberian *Green Tea Polyphenol* akan dapat menurunkan respon alergi pada mencit yang disensitisasi ovalbumin dilihat dari perubahan kadar interferon gamma (IFN- γ) dan perubahan hitung jenis eosinofil ?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan bahwa *Green Tea Polyphenol* dapat menurunkan respon alergi mencit BALB/c yang disensitisasi ovalbumin dilihat dari perubahan kadar IFN- γ dan hitung jenis Eosinofil darah tepi.

1.3.2. Tujuan khusus

1. Membuktikan adanya pengaruh *Green Tea Polyphenol* terhadap peningkatan kadar IFN- γ pada mencit yang didesensitisasi ovalbumin dan diberi *Green Tea Polyphenol* dibandingkan dengan mencit yang disensitisasi ovalbumin namun tidak diberi suplementasi *Green Tea Polyphenol*.
2. Membuktikan adanya pengaruh *Green Tea Polyphenol* terhadap penurunan hitung jenis Eosinofil darah tepi pada mencit yang didesensitisasi ovalbumin dan diberi *Green Tea Polyphenol* dibandingkan dengan mencit yang disensitisasi ovalbumin namun tidak diberi suplementasi *Green Tea Polyphenol*.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam penggunaan teh hijau sebagai minuman apakah dapat digunakan untuk menurunkan respon alergi, sehingga dapat dipakai sebagai suplemen alternatif yang dapat mengurangi gejala-gejala alergi.
2. Karena penelitian ini dilakukan pada hewan coba maka hasil penelitian ini diharapkan juga dapat memberikan landasan untuk penelitian lebih lanjut pada manusia.

1.5. ORIGINALITAS

Penelitian seperti ini belum pernah dilakukan sebelumnya, namun penelitian ini terinspirasi oleh penelitian yang dilakukan oleh Matsunaga (2001) dimana EGCg mampu meningkatkan produksi IFN- γ pada makrofag yang dipacu oleh *Legionella pneumophila*.¹¹

Didasarkan penelitian yang dilakukan oleh Terui (2001) dimana ovalbumin yang diberikan pada mencit Balb/C mampu menggeser sel granulosit yang terpicu, dimana bila respon sel Th1 dominan maka neutrofil merupakan infiltrat yang predominan sedangkan pada respon Th2 dominan eosinofil merupakan sel granulosit yang terakumulasi pada area inflamasi.¹⁴ Penelitian yang dilakukan Shiozaki (1997) dan Tachibana (2000) yang membuktikan bahwa teh hijau mampu menghambat respon alergi tipe I namun namun tidak menggunakan ovalbumin sebagai pemicu alergi.^{8,9}

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. GREEN TEA POLYPHENOL .

Teh (*Camellia sinensis*) telah dipakai sebagai minuman sehari – hari sejak ribuan tahun yang lalu di Cina dan sekarang merupakan minuman kedua yang paling banyak dikonsumsi manusia setelah air.¹⁵ Senyawa polifenol adalah kandungan aktif teh hijau yang memiliki efek terhadap sistem imun yang terdiri dari *Epigallocatechin gallate* (59,04%), *Epigallocatechin* (19,28%), *Epicatechingallate* (13,69%), *Epicatechin* (6,39%) dan *Gallocatechin* (1,60%)^{6,19,20} komponen-komponen ini dikenal sebagai catechin.¹⁵

Teh hijau adalah minuman yang dikonsumsi dengan proporsi kira-kira 1 gram daun yang diseduh dalam 100 ml air panas, dimana biasanya terkandung 30-40 % catechin dan 3-6 % kafein, bedanya dengan teh hitam adalah kadar catechinnya hanya sekitar 3 -10 %. Namun saat ini konsumen masih lebih banyak menyukai teh hitam (78 %) , Teh hijau lebih banyak dikonsumsi di Asia (20 %) namun di Cina selatan ada yang mengonsumsi teh yang difermentasi terlebih dahulu dan dikenal sebagai teh oolong (2 %).¹⁵

Green Tea Polyphenol selain lebih sering dimanfaatkan untuk mengatasi tumor dan infeksi ternyata juga banyak digunakan dalam bidang dermatologi untuk mengurangi efek UV-B terhadap kulit.⁶

Teh hijau dapat meningkatkan ketahanan limfosit penderita diabetes terhadap kerusakan DNA akibat *standard oxidative challenge* dengan hidrogen peroksida apabila penderita tersebut telah meminum teh hijau selama 2 minggu.

Efek tersebut dibutuhkan sistem imun sebab pada penderita yang terinfeksi bakteri terjadi peningkatan produksi senyawa oksigen reaktif.¹⁷ Kadar polifenol dalam plasma dari penderita tersebut meningkat dari 5,6 ng/ml menjadi 72,1 ng/ml. Berkurangnya kerusakan DNA limfosit tersebut tidak berhubungan dengan kadar vitamin C, karoten dan vitamin E dalam plasma. Sehingga dapat disimpulkan bahwa efek biologik tersebut berhubungan dengan kadar *Green Tea Polyphenol* dalam plasma.¹⁷

Sampel darah, urine dan tinja dikumpulkan selama 24 sampai 72 jam. Kadar EGC, EC dan EGCg dalam plasma meningkat ($p < 0.05$) mencapai puncaknya pada 5 jam, sedangkan ECG mencapai puncaknya pada 24 jam setelah minuman pertama. Kadar EGC dan EC dalam urin mencapai puncaknya pada 5 jam dan ke 4 *catechin* tersebut juga diekskresikan dalam tinja. Sekitar 1.68% dari catechins yang diminum terdapat dalam plasma.¹⁷

Molekul polifenol yang diberikan pada dosis tinggi (2 g per oral) mengakibatkan ditemukannya catechin bebas dalam plasma setelah 30 menit pemberian. *Catechin* yang terkonjugasi (*methyl-catechin*) mulai ditemukan setelah 2 jam pemberian, dan setelah 8 jam maka 40% dari *catechin* sudah berikatan dengan gugus *methyl*, sulfat atau glucuronida. Tetapi hanya *catechin* yang terkonjugasi ditemukan dalam plasma apabila polifenol diberikan pada dosis kecil (beberapa milligram per oral).¹⁷

Chow HH, et al (2001) melaporkan tentang kadar rata-rata EGCg bebas dalam plasma setelah pemberian EGCg dan *polyphenon E (decaffeinated green tea)* per oral secara acak pada 20 orang sehat (setiap 5 orang dengan dosis yang

sama). Masing-masing peserta meminum satu dari dosis tunggal (200, 400, 600 dan 800 mg berdasarkan kandungan EGCg). Kadar EGCg bebas dalam plasma setelah 24 jam perlakuan tersebut diperoleh: 22.5 versus 21.9, 35.4 versus 52.2, 101.9 versus 79.7, 167.1 versus 161.4 x microg EGCG/ml plasma. EGC dan EC dalam plasma berada dalam bentuk yang terkonjugasi dengan glukoronida atau sulfat. Tidak ditemukan perbedaan yang bermakna terhadap karakteristik farmakokinetik dari EGCg pada ke dua cara pemberian tersebut. Pemberian EGCg dosis tinggi (800 mg) secara signifikan meningkatkan kadar EGCg dalam plasma jika dibandingkan dengan dosis yang lebih rendah (200 mg dan 400 mg).¹⁷

Pada penelitian Gunawijaya (1995) didapatkan hasil bahwa LD-50 dari ekstrak teh hijau adalah 5,7-11,0 g/ kgBB , peneltian ini dilakukan pada mencit strain C3H.¹⁸

2.2. GREEN TEA POLYPHENOL TERHADAP SISTEM IMUN

Teh hijau meningkatkan respon proliferasi limfosit dan meningkatkan daya fagositosis makrofag.⁶ Pada penelitian tersebut mencit diberikan minuman tambahan 70 mg teh hijau setiap hari selama 4 minggu kemudian diinokulasi dengan *Listeria monocytogenes* intra peritoneal. Perlakuan tersebut meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag dan respons proliferasi limfosit.⁶

Pada perlakuan in vitro, *Epigallocatechin gallate* (komponen utama teh hijau) meningkatkan produksi IL-12 dan interferon gamma serta menurunkan produksi IL-10 pada kultur makrofag.¹⁵ Pemberian EGCG 0,5 ug/ml menghambat pertumbuhan *Legionella pneumophila* dalam kultur makrofag. Efek tersebut hilang apabila dilakukan penambahan antibodi anti-IFN- γ .¹¹

Pada penelitian Johan A. dkk, dimana mencit diberikan minuman tambahan 70 mg teh hijau setiap hari selama 4 minggu kemudian diinokulasi dengan *Listeria monocytogenes* intra peritoneal didapatkan peningkatan kemampuan fagositosis makrofag dan peningkatan respons proliferasi limfosit.¹⁹ Kemampuan teh hijau sebagai antioksidan dan pengikat ion logam berat juga telah banyak diketahui.¹⁹

Pada penelitian Shiozaki dkk. dibuktikan bahwa *Green Tea Polyphenol*, teh hitam dan teh oolong dapat menghambat reaksi *passive cutaneous anaphylaxis* (PCA) pada mencit. Dari penelitian tersebut terbukti dari semua komponen polifenol yang dicobakan antara lain Epigallocatechin gallate (EGCg), Epicatechin gallate (ECg) dan Epigallocatechin (EGC), EGCg memiliki efek penghambat paling besar dibanding ECg dan EGC. Penelitian Shiozaki tersebut membuktikan bahwa EGCg secara signifikan dapat mencegah terjadinya reaksi alergi tipe I.⁹ EGCg sebagai anti alergi dibuktikan juga oleh Tachibana H. dkk, dimana EGCg mampu menghambat produksi histamin dengan jalan menghambat kerja enzim histidin decarboxylase dan menghambat proses degranulasi basofil pada basofil manusia.⁸ Pada penelitian yang lain, Sano M. dkk., juga membuktikan bahwa pemberian secara oral dua derivat catechin yaitu Epigallocatechin 3-O-(3-O-methyl) gallate dan Epigallocatechin 3-O-(4-O-methyl) gallate dari teh oolong secara signifikan dapat menghambat reaksi alergi tipe I pada mencit yang disensitisasi dengan ovalbumin dan *incomplet Freund's adjuvant*.²⁰

EGCg terbukti juga dapat menstimulasi produksi interleukin-1 alpha (IL-1a), interleukin-1 betha (IL-1 β), dan tumour necrosis factor alpha (TNF α) oleh kultur sel mononuklear perifer.²¹ Pemberian epigallocatechin gallate in vitro dapat meningkatkan produksi interleukin-12 dan IFN- γ serta menurunkan produksi interleukin-10 pada kultur makrofag.²¹ Pemberian EGCg 0,5 ug/ml dapat menghambat pertumbuhan *Legionella pneumophila* dalam kultur makrofag. Efek tersebut hilang apabila dilakukan penambahan antibodi anti-IFN- γ dan anti-TNF-alpha.¹¹

EGCg juga memiliki efek proteksi terhadap radiasi ultraviolet yang menyebabkan imunosupresi dan imunotoleransi, dimana EGCg akan menyebabkan berkurangnya produksi IL-10 dan meningkatnya produksi IL-12 di sel epidermal dan dermal.^{6,21}

2.3. ALERGI

Alergi sering dikenal sebagai hipersensitivitas tipe I. Reaksinya bisa mengenai kulit (urtikaria dan eksema), mata (conjungtivitis), nasofaring (rhinorrhea, rhinitis), saluran nafas (asthma) dan saluran pencernaan (gastroenteritis). Keluhannya bisa hanya berupa rasa tidak nyaman namun bisa juga mengakibatkan kematian. Reaksi alergi ini biasanya membutuhkan waktu 15 – 30 menit setelah pemaparan antigen, namun bisa berlanjut sampai 10 – 12 jam. Alergi ini diperantarai oleh IgE namun komponen selular yang terlibat adalah sel mast dan basofil yang dibantu oleh platelet, netrofil dan eosinofil. Pada biopsi jaringan biasanya yang nampak adalah sel mast dan eosinofil.²²

Basofil dan sel mast mempunyai fungsi dan karakteristik yang sama, namun ada bukti yang menyatakan bahwa basofil dalam darah akan berkembang menjadi sel mast pada jaringan. Kedua tipe sel ini berikatan erat dengan reseptor untuk IgE yaitu (FcεRI) . Sel ini sangat penting pada penyakit alergi atopi seperti eksema, *hay fever* dan *asthma*. Alergen yang berikatan dengan IgE yang sudah terikat FcεRI akan memicu sel mast dan basofil untuk mengeluarkan mediator radang seperti histamin, prostaglandin, and *leukotrienes*.²³

Reaksi ini diperkuat oleh platelet activation factor (PAF) yang mengakibatkan agregasi platelet dan menimbulkan pelepasan mediator inflamasi seperti histamin, heparin dan vasoactive amine. Eosinofil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A) dan neutrofil chemotactic factor menarik eosinofil dan neutrofil yang pada akhirnya mengakibatkan pelepasan bermacam-macam enzim hidrolitik yang bisa mengakibatkan nekrosis.²²

Reaksi *anaphylaxis* ini diperantarai oleh alergen yang melekat pada antibodi IgE yang secara erat sudah berikatan dengan permukaan sel mast. Sedangkan perubahan dari sel B ke isotype IgE yang diaktifasi oleh IL-4 akan serempak akan memberi stimulus terhadap sel T.²⁴

2.3.1 ATOPI DAN SEL T HELPER 2

Istilah atopi berasal dari bahasa Yunani *atopos* yang berarti “tidak pada tempatnya”, juga sering didefinisikan sebagai penyakit yang diperantarai oleh IgE. Individu dengan atopi biasanya secara genetik memproduksi IgE untuk mengatasi alergen dari luar. Contoh penyakit atopi misalnya rinitis alergi, asthma dan eksema atopi.²²

Semua manusia menghirup alergen berupa *pollen*, *house-dust mites*, bulu kucing. Secara umum, manusia dewasa atau anak-anak tanpa atopi membentuk respon imun yang tidak berlebihan, mereka memproduksi antibodi IgG1 dan IgG4. Secara *in vitro* sel T individu tanpa alergi memproduksi IFN- γ melalui sel Th1 nya dalam jumlah cukup. Individu dengan atopi sebaliknya justru merespon alergen dengan memproduksi IgE secara berlebihan dan hal ini akan memberikan reaksi positif pada *skin-prick test*. Secara *in vitro* sel T dalam darah individu atopi memproduksi sitokin-sitokin yang diproduksi oleh sel limfosit Th2 seperti (IL-4, IL-5 dan IL-13).²²

IL-4 dan IL-13 menstimulasi produksi IgE dan molekul adhesi pada sel vaskular; IL-5 dan IL-9 berkaitan dengan perkembangan eosinofil; IL-4 dan IL-9 meningkatkan pematangan sel mast; IL-9 dan IL-13 meningkatkan *hyperresponsiveness* saluran nafas; IL-4, IL-9 dan IL-13 meningkatkan produksi mucus secara berlebihan. Eosinofil bisa mengakibatkan perlukaan pada permukaan mukosa karena mengeluarkan *toxic basic protein*, *cysteinyl leukotrienes* dan *platelet-activating factor (PAF)*. IL-5 membantu produksi eosinofil matur dan imatur dari sumsum tulang.²²

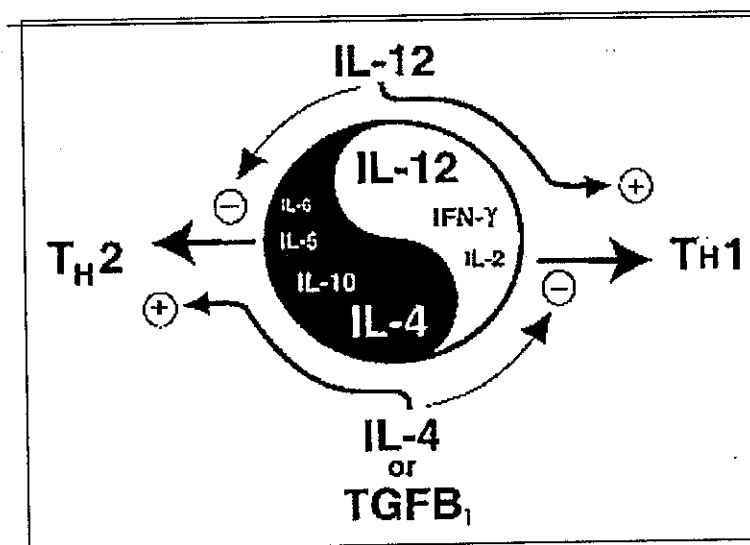
Sitokin dari Th2 memicu pembentukan sel progenitor dan menekan apoptosis pada sel mast, basofil, eosinofil pada jaringan sehingga jumlahnya tidak cepat berkurang.²⁴

Jadi mekanisme yang paling bertanggung jawab untuk reaksi alergi adalah antibodi yang diproduksi oleh sel B (IgE) dan sitokin yang diproduksi oleh sel Th2 (IL-4).²⁵

Meskipun tidak semua penyakit imunologi dapat mudah diklasifikasikan berdasarkan dominan tidaknya sel Th1 dan Th2, namun khusus penyakit alergi diketahui disebabkan karena dominannya sel limfosit Th2.¹⁶

2.4. PARADIGMA KESEIMBANGAN RESPON IMUN TH1 – TH2

Akhir akhir ini paradigma keseimbangan Th1-Th2 tersebut merupakan fokus penting dalam imunologi. Paradigma tersebut menjelaskan bahwa sistem imun memiliki 2 lengan yaitu respon imun Th1 yang umumnya mengatasi infeksi patogen intrasel dan respon imun Th2 yang mengatasi patogen ekstrasel.² Proses aktivasi sub set CD4+ yaitu sel limfosit Th1 dan Th2 berdeferensiasi dari sel limfosit Th0 karena pengaruh dari APC yang diperantarai oleh sitokin (IL-4 dan IL12), molekul permukaan sel (CD28) dan (CD80/CD86), dosis antigen dan beberapa hal yang lain.³



Gambar 1. Paradigma keseimbangan respon imun Th1-Th2

Respon imun tersebut masing-masing dikendalikan oleh sitokin yang dihasilkan sel Th1 dan sel Th2. Sel Th1 yang teraktivasi akan memproduksi IL-2,

IFN- γ dan limfotoksin, akan tetapi tidak memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-10. Kebalikannya Subset Th2 yang teraktivasi akan memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-10 akan tetapi tidak memproduksi IFN- γ dan IL-2 maupun limfotoksin. Berbagai bukti memperlihatkan bahwa sitokin-sitokin Th1 berperan pada imunitas seluler dan sel Th2 berperan menstimulasi sel limfosit B untuk memproduksi IgE sehingga berperan terhadap imunitas humoral dan terjadinya alergi.⁴

IL-10 dilaporkan memiliki peranan meningkatkan respon imun ke arah Th2, namun sebenarnya efek utama IL-10 adalah menekan respon imun Th1.³ Sel limfosit Th1 dan Th2 awalnya adalah dari sel limfosit T naïve (Th0) dimana bila diaktifasi oleh IL-12 dan IL-8 akan berdeferensiasi menjadi sel Th1 yang akan mensekresi IL-2 dan IFN- γ dan limfotoksin. Namun Th0 yang diaktivasi oleh IL-4 akan berdeferensiasi menjadi sel Th2 yang mensekresi sitokin IL-4, IL-5, IL-10 dan IL 13. Akibat dari proses tersebut maka apabila yang terinisiasi adalah sel Th1 maka sel Th2 akan mengalami *down regulation*.³

Banyak penelitian mengindikasikan bahwa respon Th2 disebabkan oleh produksi IL-4 yang tinggi atau produksi IL-12 dan IFN- γ yang rendah pada mencit Balb/C. Hipotesis ini didasarkan pada kejadian bahwa respon imun mencit Balb/C bisa merubah respon imunnya ke arah Th1 dengan cara menetralkan IL-4 melalui pemberian IL-12 pada fase awal dari infeksi. Dengan demikian dianggap bahwa tingginya produksi IL-12 dan IFN- γ dianggap penting dalam mengaktifkan respon imun Th1 pada mencit Balb/C, dimana pada saat yang sama jumlah IL-4 produksinya akan sangat menurun.⁵

Respon yang mengikuti adanya invasi dari patogen maupun alergen akan dipengaruhi oleh banyak parameter, termasuk jenis antigennya sendiri, cara masuk dari antigen, dan distribusinya pada jaringan dimana pertama kali memasuki hospes. Faktor faktor lain yang penting adalah jumlah epitop dan densitas dari *ligand*. Namun demikian lingkungan sitokin yang mengelilinginya merupakan faktor utama dalam mempengaruhi diferensiasi sel Th0 ini.⁵

Pada awal penelitian secara *invivo* respon imun terhadap patogen telah dinyatakan bahwa agen infeksius memiliki predisposisi untuk menginduksi respon imun humoral atau selular, dimana jarang terjadi *overlap* antara 2 respon imun tersebut. Dengan demikian pertahanan tubuh terhadap mikroorganisme intraselular, seperti virus dan beberapa tipe bakteri dan protozoa, cenderung didominasi oleh respon imun selular yang ditandai dengan aktifitas sitolitik selular dan produksi sitokin seperti IFN- γ dan TNF- α . Sebaliknya, pertahanan terhadap patogen ekstraselular, contohnya cacing (*helminths*), seringkali dikaitkan dengan respon imun humoral yang ditandai dengan tingginya kadar imunoglobulin spesifik untuk patogen tersebut. Adanya respon imun yang salah dapat mengakibatkan agent infeksi semakin berkembang biak, dan menimbulkan gejala penyakit yang lebih berat bahkan pada beberapa kasus mengakibatkan kematian.⁵

Sumber dari IL-4 ini adalah sel T CD4⁺, sel mast, basofil dan eosinofil. Selain IL-4, sintesa IgE juga membutuhkan adanya ikatan antara alergen dan sel B melalui *membrane-bound immunoglobulin receptor*. Sel B kemudian memproses alergen dan mempresentasikan alergen yang telah diproses berupa fragmen peptida yang berasosiasi dengan molekul MHC-II ke sel Th2. Kompleks

peptida MHC II ini akan dikenali oleh reseptor sel T (TCR) pada sel Th2. Sekali teraktifasi sel T akan memberikan sinyal kepada sel B untuk memproduksi IgE. Pertama Th2 teraktifasi akan mensekresi sitokin yang berperan untuk IgE-*switching* yaitu IL-4 dan atau IL-13. Kemudian dibutuhkan adanya kontak antara sel B dan sel T agar IgE dapat diproduksi. Kontak tersebut diperantarai oleh ligan CD40(CD40L) yang diekspresikan di permukaan sel Th2 dan CD40 yang ada di permukaan sel B.³

Sitokin yang diproduksi oleh sel Th1 dan sel Th2 ini saling menghambat satu sama lain, dimana IFN- γ (diproduksi oleh sel Th1) akan menghambat IL-4 dan IL-10 (diproduksi sel Th2) demikian pula sebaliknya.⁵

Banyak penelitian *in vitro* yang membuktikan terjadinya penurunan produksi IL-4 yang dapat menstimulasi sintesa IgE setelah diberi IFN- γ , IFN- α , TGF-b, IL-8, dan IL-12. IFN- γ dan IFN- α terbukti juga mampu menurunkan sintesa IgE *in vivo*.¹⁶

Respon imun Th1 dan Th2 keduanya bisa ditekan dengan pemaparan antigen atau suplemen melalui mukosa. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa dosis rendah dari antigen cenderung menekan respon imun Th1 namun dosis tinggi dan terus menerus dari antigen cenderung menekan respon imun Th2 dan mekanisme imunologik ini bisa mengakibatkan sistemik *down regulation* yang berlangsung sampai beberapa bulan.⁵ Apabila TCR atau sinyal yang memberikan stimulasi kurang atau tidak ada, maka aktivasi sel T ini terhalang, dan mengakibatkan toleransi.²⁶

Antigen melalui oral didegradasi pada saat memasuki usus halus, walaupun demikian penelitian pada manusia dan tikus menyatakan bahwa degradasi ini hanya parsial dan beberapa antigen secara *intact* masih terabsorpsi, terutama jika antigen ini dikonsumsi dalam jumlah besar. Banyak hal yang terkait dengan toleransi disamping interaksi sel T dengan APC pada GALT, misalnya struktur dari antigen, dosis antigen, status imun bawaan, latar belakang genetik dan imunologik individu, adjuvant dari antigen tersebut yang mempengaruhi hasil akhir dari pemberian antigen secara oral.²⁷

Peran utama dari sel dendrit adalah untuk membatasi agen-agen infeksi, yang didukung oleh peningkatan produksi IL-12 dimana akan meningkatkan juga IFN- γ dan akhirnya memberikan respon imun Th1. Permukaan mukosa pencernaan dan pernafasan merupakan lokasi yang paling sering kontak dengan patogen, jumlah terpadat populasi dari sel dendritik memang berada pada lokasi ini, sehingga proteksi awal dari respon imun juga berawal dari lapisan ini.²⁸

APC pada permukaan mukosa memiliki kemampuan unik untuk menimbulkan toleransi. APC utama pada permukaan mukosa adalah sel dendrit. Tidak seperti sel dendrit pada limpa, sel dendrit pada peyer patch dan saluran nafas memproduksi IL-10 yang bisa meningkatkan IL-4 dan berdeferensiasi lebih ke arah respon Th2. Namun pada sel dendrit limpa lebih cenderung menstimulasi respon Th1. Pada beberapa penyakit auto imun, deviasi ke arah Th2 justru menghambat penyakit tersebut.²⁶

2.5. Ovalbumin

Ovalbumin (OVA) merupakan protein utama yang berasal dari putih telur berupa glikoprotein dengan berat molekul 45.000 dalton. Molekulnya terdiri dari polipeptida berupa dua atau lebih gugus phospat dengan rantai manosa dan residu glikosamin.¹²

Sensitisasi dengan ovalbumin baik secara inhalasi, oral maupun intraperitoneal terbukti dapat merubah kecenderungan respon imun mencit ke arah Th2. Hal tersebut telah dibuktikan pada banyak penelitian.^{8,22,28,29}

Kang B (1999) membuktikan bahwa dengan pemberian ovalbumin secara oral dengan dosis 2,5 – 250 mg pada tikus Balb/C selama 4 minggu menyebabkan terjadinya toleransi respon imun tikus bertahan ke arah Th2 dominan setelah 26 minggu meskipun respon imun terhadap Th1 juga terbentuk.

¹²

Hal tersebut juga dibuktikan oleh Morokata T (2000), dimana mencit Balb/C yang disensitisasi dengan OVA dosis tinggi (lebih dari 50 mikrogram) akan menyebabkan timbulnya sitokin Th2 yang ditandai dengan meningkatnya IL-4, IL-5 dan menurunnya IFN- γ . Pada pemeriksaan paru – paru Balb/C tersebut dapatkan infiltrasi eosinofil dalam jumlah tinggi.²⁹

Pada penelitian yang dilakukan Akiyama H (2001), membuktikan mencit Balb/C yang diberi OVA peroral sebanyak 0.1 mg selama 9 minggu menunjukkan peningkatan produksi IgE spesifik terhadap OVA, peningkatan respon IgG1, peningkatan serum histamin, dan terjadi peningkatan ASA (*active systemic anaphylaxis*) yang terkait dengan histamin.¹³

Pada penelitian Saloga J (1993) membuktikan mencit Balb/C yang disensitisasi OVA dengan cara inhalasi tiap hari selama 10 hari menunjukkan peningkatan serum Ig E dan responsivitas jalan nafas. Dua hari kemudian Balb/C tersebut disuntikkan OVA secara intradermal kemudian dilakukan skin tes maka akan terbentuk *wheal* yang berarti menunjukkan adanya reaksi hipersensitifitas cepat. Reaksi positif tersebut dihubungkan adanya degranulasi sel mast. Dan apabila kelenjar limfe peribronkial Balb/C diatas ditransfer ke Balb/C yang lain yang belum disensitisasi OVA maka Balb/C resipien tersebut akan mengembangkan respon IgE spesifik terhadap OVA dan respon hipersensitifitas tipe cepat yang spesifik. Hal tersebut mengindikasikan jaringan limfoid lokal pada tempat yang disensitisasi dapat mentransfer sifat responsif terhadap allergen.³⁰

Saloga J (1994) juga membuktikan pada mencit Balb/C yang diolesi OVA di kulitnya setelah 14 hari disensitisasi OVA juga menunjukkan adanya peningkatan antibodi IgE dan IgG1 yang spesifik terhadap OVA serta terjadi peningkatan total serum IgE dan secara invitro dapat juga terdeteksi.³¹

Pada penelitian yang dilakukan Bowman dan Holt (2001) mencit yang disensitisasi dengan OVA dalam buffer saline secara intraperitoneal, atau OVA dalam incomplete Freund's adjuvant secara subkutan atau OVA dalam aluminium hydroxide secara intraperitoneal sebanyak 100 ug, dalam 28 hari dilakukan pemeriksaan skin test didapatkan peningkatan respon DTH diukur dari pembengkakan dan penebalan kulit di sekitar telinga mencit setelah 24 jam dari dilakukannya *intradermal challenge* dengan OVA.²⁰

Sensitisasi ovalbumin melalui intra peritoneal lebih menguntungkan dalam hal ketepatan dosis dan pemberian tidak perlu setiap hari, dan telah banyak penelitian mengenai alergi menggunakan cara ini.²⁰

2.6. INTERFERON GAMMA (IFN- γ)

Pada tahun 1957 ditemukan interferon (IFN) yang dihasilkan oleh sel sebagai respons terhadap virus. IFN melindungi sel sekitar terhadap serangan virus. Pada manusia, dan beberapa spesies lainnya, 3 tipe IFN, yaitu: IFN- α , dan IFN- β dihasilkan oleh sel mononuklear darah perifer dan fibroblas.³² IFN- γ diproduksi oleh semua sel CD8+ dan oleh subset sel Th1 dan sel Th0 setelah terjadi stimulasi oleh antigen. Sel NK juga memproduksi bila ada pemaparan mitogen atau IL-2, TNF α atau IL-12. Fungsi penting dari IFN- γ dalam imunitas bawaan adalah kemampuan untuk mengaktifkan mononuklear fagosit yang secara langsung menginduksi sintesa enzim yang membantu *oxidative burst* dan mekanisme *microbicidal* seperti memproduksi *nitrogen oxide*.³²

IFNs bekerja dengan cara mengubah ekspresi membran sel, mengubah produksi dan sekresi protein selular dan meningkatkan maupun menurunkan fungsi sel efektor pada tubuh.³²

Secara bersamaan IFN- γ dan IL-12 merupakan sitokin utama yang membentuk diferensiasi ke arah sel Th1. Sehingga IFN- γ mempunyai efek mencegah pembentukan sel Th2. IFN- γ sangat kuat dan bisa berperanan secara spesifik menghambat IL-4.² Sedangkan IL-4 adalah sitokin yang diproduksi oleh limfosit dan sel mast, dimana mampu menginduksi differensiasi dari sel limfosit Th2 dan memicu sel B untuk memproduksi Ig-E dan IgG4.³

Penelitian sebelumnya pernah membuktikan bahwa IFN- γ yang mendominasi respon imun, secara signifikan mampu menurunkan insiden asma. Penelitian lain menyatakan bahwa pemberian IFN- γ atau IL-12, yang menginduksi respon imun ke arah Th1 dilaporkan bisa menekan eosinofilia pada saluran nafas dan produksi IgE pada mencit.⁵

2.6.1. RESEPTOR PADA IFN- γ

Produksi IFN- γ oleh sel T dan sel NK, merupakan sitokin yang sangat penting dalam pertahanan terhadap patogen intraseluler. Pada penelitian ini vivo dan in vitro didapatkan heterodimer dari IL-12 merupakan *inducer* yang paling poten dan paling penting terhadap sintesis IFN- γ . Pada saat awal dari infeksi sel T prekursor yang terekspos oleh IFN- γ berinteraksi dengan APC pada jaringan limfoid. IL-12 berikatan erat dengan reseptor (terdiri dari $\beta 1$ dan $\beta 2$ sub unit) yang diekspresikan oleh antigen yang merangsang sel selanjutnya terjadi signal transduksi melalui STAT-4, menghasilkan transkripsi gen IFN- γ .³²

Namun belum dijelaskan apakah pemaparan yang terus menerus oleh IL-12 diperlukan oleh limfosit Th1 untuk tetap memproduksi sitokin Th1. Pengamatan bahwa limfosit Th2 tidak responsif terhadap IL-12 karena keberadaan rantai IL-12 $\beta 2$ reseptor (*IL-12R $\beta 2$ chain*) hanya dimiliki oleh sel Th1 dalam rangka program diferensiasi yang kemudian mengakibatkan sekresi IL-12 dari makrofag.³²

2.7. EOSINOFIL

Eosinofil merupakan leukosit bergranula yang berasal dari sumsum tulang. Dinamakan eosinofil oleh karena granulanya mengandung arginin yang kaya akan

protein yang akan berwarna merah apabila diberi pewarnaan acidic eosin. Normalnya eosinofil ini berdiameter 8 um, hanya sedikit di sirkulasi dan kebanyakan ditemukan di jaringan terutama di jaringan ikat seperti saluran nafas, usus, epitel urogenital.²⁴

Sumsum tulang dari manusia normal berisikan 3 % eosinofil dimana 37 %nya sudah matur, Proses maturasi eosinofil membutuhkan sekitar 13 hari. Migrasi dari sum-sum tulang ke sirkulasi darah membutuhkan waktu 3.5 hari.²⁴ Waktu paruh dari eosinofil kira-kira 18 hari dan umurnya hampir sama dengan neutrofil yaitu 26 hari. Namun waktu paruh dari eosinofil ini akan menjadi lebih panjang ketika terjadi eosinofilia, hal ini mungkin disebabkan karena adanya peningkatan konsentrasi dari sitokin yang beredar sehingga meningkatkan survival dari eosinofil dan meningkatkan kemampuan eosinofil untuk bisa bermigrasi ke jaringan.²⁴ Secara umum eosinofil memiliki 2 lobus nukleus yang berisi kromantin padat. Gambaran yang paling menyolok dari eosinofil adalah adanya granula-granula berbentuk spheris dan oval yang menempati hampir 1/5 dari sitoplasma. Granula ini dapat dibedakan menjadi 4 macam (granula primer, granula sekunder , granula kecil dan lipid bodies) . Dan diketahui juga bahwa granula ini berisi protein yang berlimpah, dengan berbagai aktifitasnya sebagai enzim.²⁴

Pada manusia jumlah eosinofil sekitar 2% sampai 10 % dari jumlah leukosit yang ada pada darah perifer. Variasi jumlah tertinggi eosinofil nampak pada sore dan pagi hari. Eosinofil yang sudah mendominasi suatu jaringan (biasanya jaringan yang memiliki epitel kolumnar pada permukaannya) tidak

masuk kembali ke sirkulasi. Ternyata dalam berbagai penelitian didapatkan kesimpulan bahwa peningkatan jumlah eosinofil pada sirkulasi dan sebaran eosinofil pada jaringan sangat terkait dengan alergi dan infestasi cacing.²⁴

Eosinofil memerlukan GM-CSF, IL-3 dan IL-5 untuk proses pematangannya. Dalam keadaan normal jumlahnya berkisar 2-4% dari seluruh jumlah leukosit darah perifer. Granula eosinofil berisi sejumlah faktor seperti histamin, *acid phosphatase* dan *major basic protein*. Eosinofil ini sangat penting untuk membasmi parasit, memfagosit kompleks antigen-antibodi.³³

Yang pertama kali mengontrol produksi eosinofil adalah sumsum tulang. Eosinofil hanya diproduksi sedikit apabila tidak ada infeksi. Akan tetapi apabila sel Th2 teraktifasi, sitokin seperti IL-5 akan dilepaskan dan hal tersebut dapat meningkatkan produksi eosinofil di sumsum tulang dan akan melepaskannya ke dalam sirkulasi.³³

Hal tersebut dibuktikan pada percobaan yang dilakukan pada mencit transgenik yang mengekspresikan IL-5 didapatkan jumlah eosinofil yang meningkat (eosinofilia) pada sirkulasi, akan tetapi tidak pada jaringannya.^{16,34} Hal tersebut mengindikasikan bahwa migrasi eosinofil dari sirkulasi ke jaringan diatur secara terpisah oleh sekelompok pengontrol yaitu CC kemokin yang menyebabkan kemotaksis beberapa jenis leukosit. Khusus eosinofil CC kemokin tersebut ada 2 macam yang biasa disebut eotaxin1 dan eotaxin 2. Eosinofil yang bekerja pada reaksi inflamasi lokal dengan mengeluarkan arylsulphatase. Histaminase, phospholipase-D dan prostaglandin E.¹⁰

Pola gerakan sel-sel *eosinofil* sangat dipengaruhi juga oleh sitokin yang

dikeluarkan oleh sel epitelial (terdapat pada permukaan mukosa). Aktivasi sel epitelial ini terjadi karena polutan, infeksi virus dan alergen lain. Adanya aktivasi sel epitelial ini juga ditandai dengan meningkatnya konsentrasi *nitric oxide* yang saat ini merupakan marker yang potensial untuk mengukur proses peradangan.¹⁰

Penelitian yang dilakukan oleh Terui (2001) dimana ovalbumin yang diberikan pada mencit Balb/C mampu menggeser sel granulosit yang terpicu , dimana bila Th1 dominan maka neutrofil merupakan infiltrat yang predominan sedangkan pada Th2 dominan eosinofil adalah sel granulosit yang terakumulasi pada area inflamasi.¹⁴

Adanya akumulasi eosinofil ini memberikan efek yang merugikan dimana eosinofil merupakan efektor yang poten dalam mengakibatkan peradangan berat pada jaringan.²⁰ Namun di sisi lain akumulasi Eosinofil sangat diperlukan sebagai pertahanan terhadap parasit. Maka dari itu mengetahui proses yang mempengaruhi lalu lintas eosinofil ini penting untuk diketahui terutama proses molekulernya dalam hal ini adalah sitokin yang mempengaruhinya.¹⁰

Penelitian pada beberapa dekade yang lalu memperlihatkan bahwa proses inflamasi paru pada pasien asthma didominasi oleh peranan eosinofil, basophil, sel mast dan IgE. Saat ini penjelasan tentang sel limfosit T helper yang mampu memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-13 mengakibatkan umur panjang dan amplifikasi respon inflamasi berupa meningkatnya produksi IgE ; meningkatkan *recruitment* dan pematangan eosinofil yang secara langsung mengakibatkan hipereaktifitas saluran nafas. Sehingga terapi asthma pada saat ini lebih banyak ke arah

menetralisasi faktor-faktor inflamasi ini dan mengurangi jumlah eosinofil, limfosit dan mengurangi kadar IgE.⁴

Respon imun Th2 yang diperantarai oleh sel CD4⁺ yang mensekresi sitokin seperti IL-4, IL5, IL-10 dan IL-13 semuanya berperan penting pada respon alergi. IL-13 pada manusia berperan mengatur produksi IgE sedangkan IL-5 bertanggung jawab terhadap pematangan dan aktivasi eosinofil.⁴

IL-4 dan IFN- γ seringkali dianggap memiliki hubungan antagonistik. IFN- γ mampu memblok produksi IgE dan IgG, sementara IL-4 memblok IgG_{2A}. Pola dari IL-4 dan IL-5 sama-sama mengaktifkan eosinofil melawan alergen, IgE sangat membantu proses ini sebagai faktor opsonisasi sehingga bisa terjadi sekresi dari granula pada eosinofil. IL-4 sendiri mengekspresikan molekul adhesi yang bisa menggiring eosinofil ke lokasi pemaparan.¹⁰ Sitokin-sitokin Th2 yang berperan penting dalam mempengaruhi akumulasi eosinofil. Proses yang terjadi adalah akibat dari eosinofil bergerak (chemotactic response) ke arah CC chemokine (eotaxin1 dan eotaxin2) yang terbentuk. Dimana sitokin Th2 dapat yang mempengaruhi sum-sum tulang untuk meningkatkan produksi eosinofil dari sel progenitor, disamping ada pula sitokin yang menghambat apoptosis eosinofil pada jaringan.³⁵

2.7. TEHNIK PEMERIKSAAN EOSINOFIL

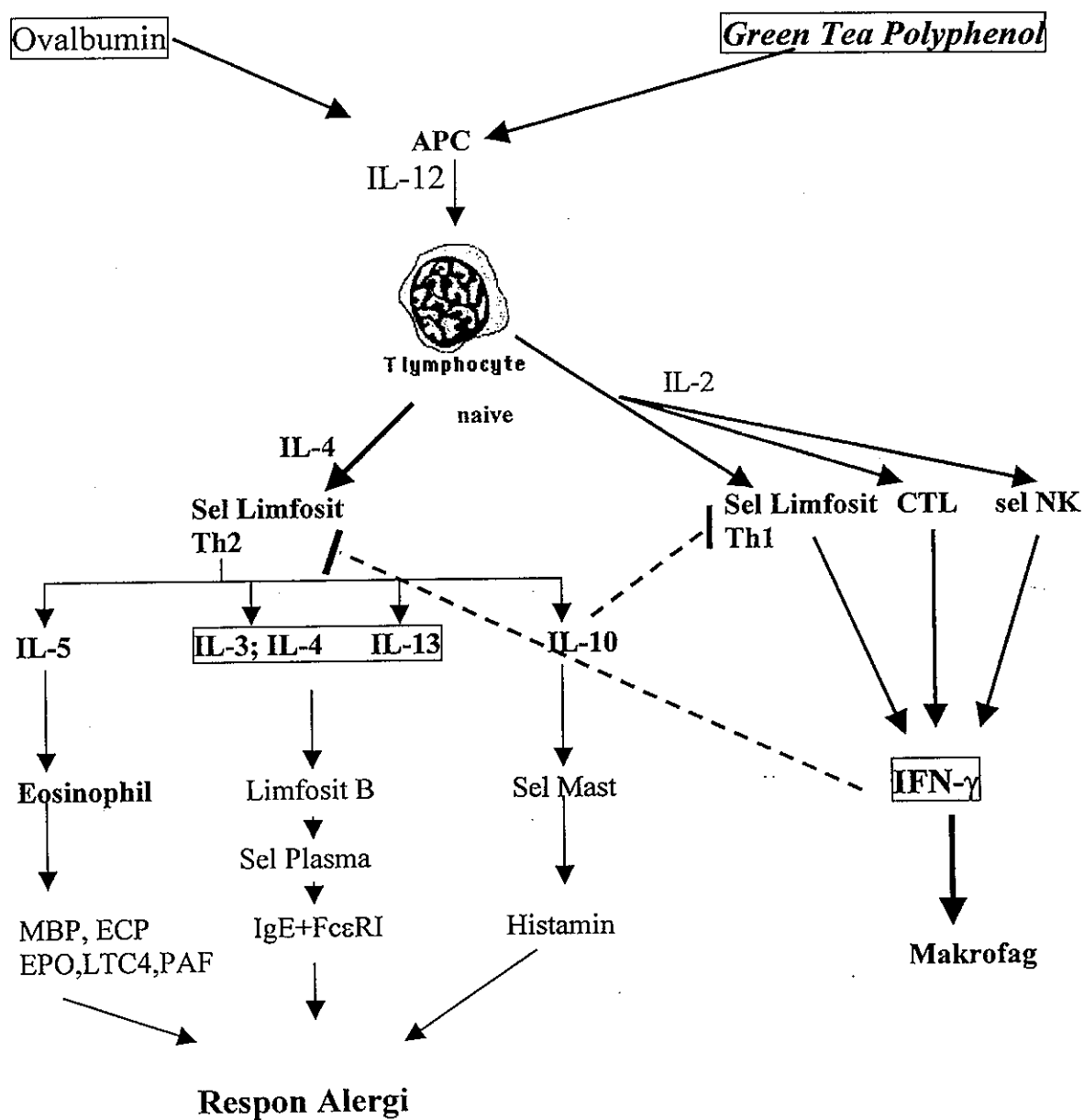
Eosinofil darah tepi bisa dihitung secara kuantitatif dengan berbagai cara misalnya hitung jenis eosinofil dengan pengecatan giemsa atau dengan pemeriksaan eosinofil absolut, bisa juga dihitung dengan pengecatan cara Dacie. Sedangkan jumlah eosinofil pada cairan peritoneum bisa diperiksa dengan

menambahkan trypan blue, PBS dan heparin pada cairan intraperitoneal, dengan pengecatan My-Grunwald-Giemsa. Kendala pemeriksaan dari pemeriksaan selain menggunakan hitung jenis eosinofil adalah penggunaan sampel (darah/ cairan intra peritoneal) segar yang langsung dicampur dengan reagen dan harus segera diperiksa menggunakan hemositometer sehingga tidak dapat disimpan lama untuk pemeriksaan kemudian hari. Selain itu gambaran morfologi eosinofil paling mudah dikenali adalah dengan menggunakan pengecatan Giemsa pada pemeriksaan hitung jenis eosinofil, dengan pengecatan lain morfologi yang ada lebih sulit dikenali sebagai eosinofil.¹⁰

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. KERANGKA TEORI



Keterangan :

LTC4 : Leukotrien

MBP : Major Basic Protein

ECP : Eosinophil Chemotactic Protein

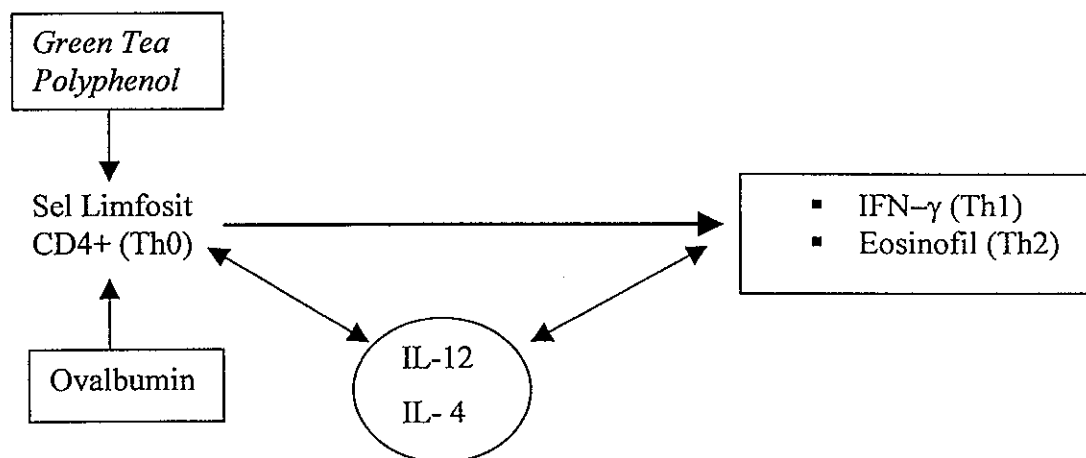
EPO : Eosinophil peroxidase

PAF : Platelet Activating Factor

—> Memacu

- - - | Menghambat

3.2. KERANGKA KONSEP



3.3. KETERBATASAN PENELITIAN :

Pemeriksaan eosinofil dengan sampel yang berasal dari darah tepi menggunakan tehnik hitung jenis eosinofil memiliki keterbatasan yaitu tidak dapat menilai jumlah eosinofil pada area yang terpapar dalam hal ini adalah cairan peritoneum. Peneliti tidak menggunakan tehnik pemeriksaan jumlah eosinofil dari cairan intra peritoneum karena pada penelitian pendahuluan penilaian morfologi eosinofil tidak dapat dikenali dengan jelas, sedangkan pada pemeriksaan hitung jenis eosinofil dengan pengecatan giemsa gambaran morfologi eosinofil cukup jelas.

3.4. HIPOTESIS PENELITIAN

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini

1. Terdapat peningkatan kadar IFN- γ pada kelompok mencit yang disensitisasi ovalbumin dan diberi *Green Tea Polyphenol*
2. Terdapat penurunan hitung jenis eosinofil darah tepi pada kelompok mencit yang disensitisasi ovalbumin dan diberi *Green Tea Polyphenol*.

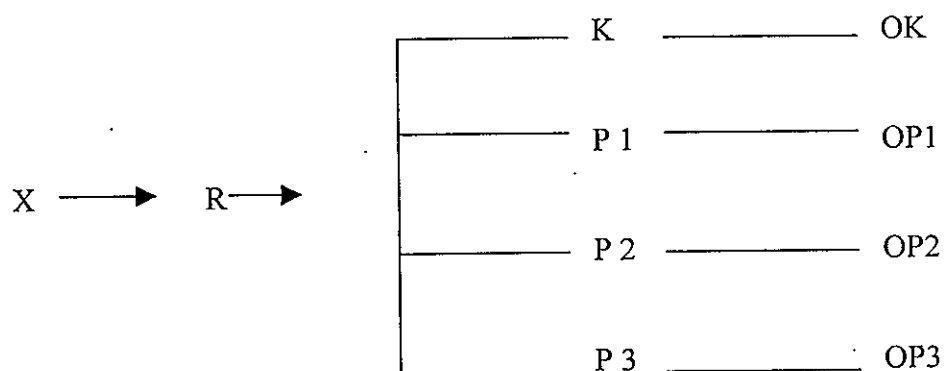
BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *The Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian. Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*Completely randomized design*), randomisasi sederhana dilakukan dengan komputer. Perlakuan adalah dengan pemberian ovalbumin dan Green Tea Polyphenol/ *GTP* pada mencit. Sedangkan keluarannya (*outcome*) berupa perubahan respon imun *naive* sel T CD4⁺ (Th0) ke arah Th1 dominan yang dilihat dari perubahan kadar interferon gamma dan perubahan hitung jenis eosinofil darah.

Mencit yang telah menjalani adaptasi selama 1 minggu dibagi menjadi 4 kelompok secara acak masing-masing 6 ekor, yaitu:



Keterangan:

X → R : masa adaptasi selama 1 minggu

R : Randomisasi

K : Kontrol, dipakai sebagai pembanding mencit hanya mendapat pakan standar, tidak disensitisasi dengan ovalbumin dan tidak diberi suplementasi *GTP* .

P1 : Perlakuan 2, mencit mendapat pakan standar, disensitisasi dengan OVA 10 ug dalam 100 ug alum adjuvant intra peritoneal pada hari pertama, kemudian di booster lagi dengan OVA dalam alum adjuvant dengan dosis yang sama pada hari ke 14 dan **tidak diberi *GTP*** .

P2 : Perlakuan 3, mencit mendapat pakan standar, disensitisasi dengan OVA 10 ug dalam 100 ug alum adjuvant intra peritoneal pada hari pertama, kemudian di booster lagi dengan OVA dalam alum adjuvant dengan dosis yang sama pada hari ke 14 dan **diberi *GTP* peroral** (dalam air minum)sebanyak **1,5 mg / hari / tikus** selama 24 minggu (hari 1 s/d hari 28)

P3 : Perlakuan 4, mencit mendapat pakan standar, disensitisasi dengan OVA dosis 10 ug dalam alum adjuvant 100 ug intraperitoneal pada hari pertama, kemudian di booster lagi dengan OVA dalam alum adjuvant dengan dosis yang sama intraperitoneal pada hari ke 14 dan **diberi *GTP* peroral** (dalam air minum) sebanyak **6 mg/hari / tikus** selama 4 minggu .(hari 1 s/d hari 28)

OK : Pengamatan pada mencit kelompok kontrol

OP1 : Pengamatan pada mencit dengan perlakuan 1

OP2 : Pengamatan pada mencit dengan perlakuan 2

OP3 : Pengamatan pada mencit dengan perlakuan 3

4.2. POPULASI DAN SAMPEL

4.2.1. POPULASI

Populasi penelitian ini adalah mencit strain Balb/C usia 6 minggu. Strain mencit yang dipilih adalah Balb/C sebab mencit Balb/C pada umur 6 – 12 minggu dilaporkan dapat menimbulkan reaksi alergi (ditandai dengan eosinofilia) apabila mencit tersebut disensitisasi dengan ovalbumin.

Penentuan jenis kelamin mencit ini perlu dilakukan karena hormon estrogen, progesteron dan testoteron dapat mempengaruhi respon imunitas. Pada mencit betina yang berumur 7 minggu telah terjadi stadium ovulasi yang waktunya berbeda antara mencit yang satu dengan mencit yang lain sehingga rasio kadar estrogen dan progesteron pada tiap mencit berbeda-beda. Oleh karena itu pada penelitian ini dipilih mencit dengan jenis kelamin jantan.

4.2.2. SAMPEL

4.2.2.1. BESAR SAMPEL

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan derajat bebas error sebesar 15. Jumlah unit percobaan 4 dengan ulangan masing-masing 6 untuk setiap unit. Ulangan ditentukan menurut rumus :

$$r = 1 + \frac{15}{(t-1)} \quad \text{yang diturunkan dari rumus } (t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

r : jumlah ulangan

t : jumlah perlakuan

Jadi jumlah seluruh mencit yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor.

4.2.2.2. CARA PENGAMBILAN SAMPEL

Sampel diambil dari mencit yang secara genetis sifatnya sama, maka pengambilan secara random atau tidak, tidak menjadi masalah. Untuk menghindari bias

karena faktor variasi umur dan berat badan, maka pengelompokan sampel dilakukan secara acak.

Sebelum diberikan perlakuan, mencit diadaptasikan dulu selama 1 minggu.

Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

Setelah menjalani masa adaptasi mencit dibagi menjadi 4 kelompok secara acak.

4.3. VARIABEL PENELITIAN

4.3.1. VARIABEL BEBAS :

Sebagai variabel bebas dalam penelitian ini adalah :

1. Pemberian *Green Tea Polyphenol* sebagai imunomodulator. *GTP* diperoleh dari Sigma-Aldrich Pte.Ltd. dengan nomor catalog A5503-1G. Dosis yang dipakai adalah 1,5 mg/hari/ mencit dan 6 mg/hari/mencit. Penentuan dosis dengan cara konversi dari dosis manusia ke dosis mencit, dimana perbandingannya 1: 0,0026. Sehingga hasil perhitungan dosis seperti tabel sebagai berikut :

Tabel 1
Perhitungan dosis *Green Tea Polyphenol*

EGCg pada Penelitian manusia	<i>Green Tea polyphenol</i> 100	<i>Green Tea Polyphenol</i> 60	DOSIS PADA MENCIT (x 0,0026)
100 mg	166,6 mg	277,9 mg	0,75 mg
200 mg	333,3 mg	555,7 mg	1,5 mg
400 mg	666,7 mg	1111,4 mg	3 mg
800 mg	1333,3 mg	2222,8 mg	6 mg

2. Pemberian ovalbumin dalam alum adjuvan intraperitoneal sebagai sensitisasi.

Ovalbumin yang dipakai berasal dari *albumin chicken egg grade V* yang diperoleh dari Sigma-Aldrich Pte.Ltd dengan nomor catalog P1204-25G. Alum adjuvan diperoleh dari Sigma-Aldrich Pte.Ltd dengan nomor catalog A1577.

4.3.2. VARIABEL TERGANTUNG

Variabel Tergantung pada penelitian ini adalah :

1. Kadar IFN- γ yang diperiksa berasal dari supernatan kultur sel limfosit yang diambil dari limpa, diperiksa dengan alat ELIZA reader untuk menentukan kadar dalam satuan pg/ml.
2. Hitung jenis eosinofil yang diambil dari darah tepi mencit, diperiksa dengan metoda hitung jenis eosinofil dengan satuan eosinofil/100 lekosit.

4.3.3. VARIABEL ANTARA

Variabel antara pada penelitian ini adalah :

1. IL-12
2. IL- 4

Namun tidak dilakukan pemeriksaan pada kedua variabel antara tersebut karena keterbatasan jumlah supernatan kultur sel limfosit yang diambil dari limpa.

4.3.4. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Skala	Satuan
Variabel Bebas			
Pemberian <i>Green Tea Polyphenol</i> sebagai imuno-modulator	<i>GTP</i> merupakan komponen teh hijau yang dapat dipakai untuk memodulasi sistem imun. Yang terdiri dari <i>Epigallocatechin gallate</i> , <i>Epigallocatechin</i> , <i>Epicatechingallate</i> , <i>Epicatechin</i> dan <i>Gallocatechin</i>	Nominal	mg
Pemberian OVA sebagai pencetus respon imun pro alergi	OVA merupakan protein utama putih telur berupa glikoprotein yang dapat merubah kecenderungan respon imun mencit ke arah Th2	Nominal	ug
Variabel terikat			
1. Kadar IFN- γ	Kadar interferon gamma dalam supernatan limfosit yang telah diinkubasi selama 3 X 24 jam diukur dengan metode ELISA	Rasio	pg/ml
2. Hitung Jenis Eosinofil	Jumlah eosinofil dihitung dengan hitung jenis leukosit (<i>Differential counting Leukocyte</i>).	Rasio	per 100 lekosit

4.4. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di :

- Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran UNDIP untuk pemeliharaan mencit.

- Laboratorium Bioteknologi Universitas Diponegoro untuk kultur sel limpa dan pengambilan sampel darah.
- Laboratorium Bioteknologi Universitas Gajah Mada untuk pemeriksaan kadar IFN- γ dengan menggunakan ELISA reader

dilaksanakan sekitar bulan Agustus s/d Desember 2002

4.5. BAHAN DAN MATERI PENELITIAN

- Mencit strain Balb/C umur 6 minggu, diperoleh dari Pusvetma (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya, dengan :
Kriteria inklusi : mencit betina strain Balb/C, umur 6 minggu, sehat dan tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak.
Kriteria eksklusinya adalah : mencit tampak sakit (tidak aktif) serta tampak adanya abnormalitas anatomis.
- Darah perifer dari mencit strain Balb/C yang diteliti.
- Limpa dari mencit strain Balb/C yang diteliti.
- Ovalbumin dalam alum adjuvant yang diperoleh dari Sigma-Aldrich Pte.Ltd
- *Green Tea Polyphenol* yang didapat dari Sigma-Aldrich Pte.Ltd
- Reagen interferon gamma (IFN- γ) yang diperoleh dari R and D Netherland

4.6. ALAT/ INSTRUMEN PENELITIAN

- | | |
|---|---------------------|
| - 24 buah kandang hewan coba individual | - Spuit disposable |
| - Kanul mulut | - Tabung reaksi |
| - Mikroskop cahaya | - Pinset |
| - Object glass | - Timbangan digital |
| - Jarum untuk tes alergi no 27 | - Kit IFN- γ |

4.7 . PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

- 24 ekor mencit jantan strain Balb/C, umur 6 – 8 minggu, diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standar selama 1 minggu ad libitum.
- 24 ekor mencit tersebut kemudian dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing 6 ekor yang ditentukan secara acak. Masing – masing kelompok dikandangkan secara individual.
- Masing – masing kelompok mendapatkan pakan standar yang sama.
- Kelompok perlakuan pertama mencit mendapat pakan standar, pada hari pertama mencit disensitisasi dengan OVA 10 ug dalam alum adjuvant 100 ug intraperitoneal, kemudian di booster lagi dengan OVA dalam alum adjuvant dalam dosis yang sama intra peritoneal pada hari ke 14 .

Pada hari ke 29 dilakukan pengambilan sampel.

- Kelompok perlakuan kedua mencit selain mendapat pakan standar, juga diberi *GTP* peroral sebanyak 1,5 mg /hari/ tikus selama 4 minggu (hari 1 s/d hari 28).
Pada hari ke 29 dilakukan pengambilan sampel.
- Kelompok perlakuan ketiga, mencit selain mendapat pakan standar, juga diberi *GTP* peroral sebanyak 6 mg / hari / tikus selama 4 minggu (hari 1 s/d hari 28) dan disensitisasi dengan OVA dengan dosis 10 ug dalam alum adjuvan 100 ug secara intra peritoneal pada hari pertama , kemudian di booster lagi dengan OVA dalam alum adjuvant dengan dosis yang sama pada hari ke-14.
- Darah tepi diambil dari ekor mencit untuk memeriksa hitung jenis eosinofil darah tepi.

- Limpa diambil untuk diambil supernatannya yang berasal dari kultur limfosit, sebagai bahan untuk memeriksa kadar IFN- γ .

4.8. ALUR KERJA

24 EKOR MENCIT (usia 6 minggu)
yang telah diadaptasi selama 1 minggu
(Diberi pakan standar ad libitum)

↓
SECARA ACAK DIBAGI MENJADI 4 KELOMPOK

KONTROL(K1) 6 EKOR	P1 6 EKOR	P2 6 EKOR	P3 6 EKOR
OVALBUMIN (-)	OVA(+) Hari 1 : 10 ug / 100 ug Alum i.p. Hari 14 : 10 ug / 100ug alum i.p.	OVA (+) Hari 1 : 10 ug / 100 ug Alum i.p. Hari 14 : 10 ug / 100ug alum i.p.	OVA(+) Hari 1 : 10 ug / 100 ug Alum i.p. Hari 14 : 10 ug / 100ug alum i.p.
GTP (-)	GTP (-)	GTP (+) Hari 1- 28 : Dosis : 1,5 mg/ hari dalam air minum (Peroral)	GTP (+) Hari 1- 28 : Dosis : 6 mg/ hari dalam air minum (Peroral)

DIPERIKSA :

Pada hari ke 29 :

- Limpa : Kadar IFN- γ
- Darah perifer : hitung jenis eosinofil darah.

4.9. PEMERIKSAAN

4.9.1. PEMERIKSAAN HITUNG JENIS EOSINOFIL

Pemeriksaan eosinofil dilakukan dengan memakai hitung jenis leukosit (*defferential counting leukocyte*) dengan pewarnaan giemsa. Pada hitung jenis leukosit, Eosinofil dihitung per 100 leukosit.

4.9.1.1. PEMBUATAN SEDIAAN HAPUS DARAH

1. Sediakan kaca obyek yang kering, bebas debu dan bebas lemak. Untuk menggeserkan darah pada kaca obyek dipakai kaca obyek yang lain yang sisi pendeknya rata sekali.
2. Sentuhlah tanpa menyentuh kulit setetes darah kecil (garis tengah tidak melebihi 2 mm) dengan kaca obyek, kira-kira 2 cm dari ujungnya dan letakkan kaca itu di atas meja dengan tetes darah di sebelah kanan.
3. Dengan tangan kanan letakkan kaca obyek yang lain di sebelah kiri tetes darah tadi dan digerakkan ke kanan hingga mengenai tetes darah.
4. Tetes darah akan menyebar pada sisi kaca penggeser itu. Tunggulah sampai darah itu menyampai titik kira-kira 0,5 cm dari sudut kaca penggeser.
5. Segeralah geserkan kaca itu ke kiri sambil memegangnya miring dengan sudut antara 30 – 45 derajat. Janganlah menekan kaca penggeser itu ke bawah.
6. Biarkan sediaan itu kering di udara.
7. Beri label pada preparat tersebut.

4.9.1.2. PEWARNAAN SEDIAAN HAPUS DARAH

1. Letakkan sediaan yang akan dipulas di atas rak tempat memulas dengan lapisan darah ke atas.

2. Teteskan sekian banyak metil alkohol keatas sediaan, sehingga bagian yang terlapis darh tertutup seluruhnya. Biarkan selama 5 menit atau lebih lama.
3. Tuanglah kelebihan metil alkohol dari kaca.
4. Liputilah sediaan itu dengan Giemsa yang telah diencerkan dengan larutan penyanggah dan biarkan selama 20 menit.
5. Bilaslah dengan air suling.
6. Letakkan sediaan dalam sikap vertikal dan biarkan menering pada udara.

4.9.1.3. PEMBACAAN HITUNG JENIS SEDIAAN DARAH HAPUS

4.9.1.4. CARA PERHITUNGAN EOSINOFIL :

Estimasi jumlah Sel Darah putih dengan menggunakan lensa pembesaran 100x untuk melihat daerah yang luas, kemudian mengamati populasi SDP yang ada di daerah ekor preparat, sepanjang tepi –tepi preparat dan di zona V serta IV. Selanjutnya melakukan hitung jenis SDP dengan pembesaran 400x . Perhitungan dimulai dari ekor preparat sepanjang mungkin , kemudian lapangan pandang digeser ke arah badan preparat sampai mencapai zona IV dimana terdapat konsentrasi seri limfosit yang matur.

TABEL PEMBANTU HITUNG JENIS LEKOSIT

[illegible]

4.9.2. PEMERIKSAAN KADAR IFN- γ

4.9.2.1. PROSEDUR KULTUR SPLENOSIT

- Alat :
1. Pemananas alkohol
 2. Beaker glass volume 50-75 cm
 3. gunting
 4. pinset
 5. petri disk plastik
 6. refrigerated centrifuge
 7. pipet pasteur
 8. laminar flow hood

- Bahan :
1. Sodium penthobarbiol
 2. ethanol 70 % v/v
 3. free Hank's Balance d salt solution (CMF-GBSS)
 4. lysing buffer (NH₄Cl 0,17 M)
 5. Roxwell Park Memorial Institute (RPMI) 1640
 6. Fetal Bovine Serum (FBS) Glutamin
 7. Penicillin streptomycin

4.9.2.2. Prosedur Pengambilan sampel dan kultur sel limfosit:

- a. Mencit dibunuh dengan dislokasi vertebra servikal atau inhalasi dengan penthobarbital, dibaringkan terlentang dan seluruh permukaan ventral disemprot dengan ethanol 70 %
- b. Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen, robek kulit menggunakan 2 pinset ke arah kepala dan ekor mencit,

sehingga kulit terkelupas dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan ethanol 70 % untuk menyingkirkan bulu-bulu yang rontok.

- c. Peritoneum dilipat ke atas, angkat limpa menggunakan pinset. Pisahkan limpa dari pembuluh darah dan jaringan sekitarnya menggunakan gunting. Letakkan limpa pada petri dish berisi 1,5 ml HBSS.
- d. Hancurkan limpa dengan menggunakan pinset.
- e. Gunakan pipet Pasteur untuk memindahkan suspensi sel ke tabung pemusing. Biarkan sel-sel yang mengumpul mengendap selama 5 menit.
- f. Pindahkan suspensi sel ke tabung yang lain dan pusingkanlah sel pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C . Pelet yang didapat diresuspensikan dalam 2 ml lysing buffer pada suhu ruangan (25 °C) untuk melisiskan eritrosit, lalu pusingkan pada kecepatan 200xg selama 10 menit pada suhu 4°C.
- g. Buang supernatan dan pellet dicuci 2x menggunakan RPMI dengan cara dipipet berulang-ulang dan dipusingkan dengan kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C.
- h. Hitung sel-sel menggunakan hemocytometer.
- i. Pada 1 limpa kira-kira didapatkan 1×10^6 sel splenosit dalam 3 cc RPMI
- j. Kemudian tiap sumuran diberi PHA dengan ukuran '10 ug/ml' selama 3 hari.

4.9.2.2. PENGUKURAN KADAR IFN- γ DENGAN MENGGUNAKAN *IFN- γ KIT FOR MOUSE*.

Kadar IFN- γ dalam supernatan limfosit yang telah diinkubasi selama 3 X 24 jam diukur dengan metode ELISA.

Prosedur pemeriksaan IFN- γ :

Reagen (kit) yang tersedia dari R and D Netherland berisi :

1. Microplate berlapis Ab monoklonal spesifik terhadap IFN- γ mencit
2. Konjugat IFN- γ mencit
3. Pengencer konjugat IFN- γ mencit
4. Kontrol IFN- γ mencit.
5. Cairan pengencer sampel
6. Pengencer kalibrator
7. Buffer pencuci
8. Reagen pewarna A dan B
9. Stop solution

Persiapan Reagen :

1. Pembuatan kontrol :
Larutkan kontrol (pada kit) dengan H₂O deionisasi.
2. Pembuatan konjugat :
Tambahkan 0,5 ml konjugat dengan 11 ml pengencer konjugat pada tabung steril.
3. Pembuatan buffer :
Tambahkan 25 ml buffer pencuci pada 600 ml H₂O deionisasi
4. Larutan substrat :
Campurkan reagen pewarna A dan B dalam volume sama
5. Pembuatan standar :

Larutkan standar dengan 2ml pengencer kalibrator, menghasilkan konsentrasi larutan stok standar IFN- γ 3000 pg /ml

6. Pengencer standar : masukkan 400 ul pengencer kalibrator pada tabung dan tambahkan 100 ul larutan stok standar IFN- γ 3000pg/ml, untuk mendapatkan konsentrasi IFN- γ 600pg/ml. Buat pengenceran bertingkat.

Pengukuran kadar IFN- γ dengan ELISA Reader:

1. Siapkan reagen, sampel dan standar sesuai petunjuk
2. Siapkan microplate
3. Tambahkan 50ul cairan pengencer pada tiap sumuran
4. Tambahkan 50 ul cairan standar, kontrol, atau sampel pada tiap sumuran.
Campur dengan cara mengetuk plate perlahan selama 1 menit. Tutup microplate, inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang
5. Aspirasi tiap sumuran dan cuci sumuran tersebut dengan buffer pencuci.
Ulangi pencucian 4 kali. Setelah pencucian terakhir, buang semua buffer pencuci dengan cara aspirasi atau membalikkan microplate pada kain bersih
6. Tambahkan 100 ul cairan konjugat pada tiap sumuran. Tutup microplate dan inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang.
7. Ulangi aspirasi (sesuai tahap 5)
8. Tambahkan 100 ul cairan substrat pada tiap sumuran. Inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Jangan terkena cahaya langsung.
9. Tambahkan 100 ul stop solution pada tiap sumuran. Campur dengan cara mengetuk plate perlahan.

10. Periksa absorbansi dengan menggunakan microplate reader dengan absorbansi 450 nm dalam 30 menit.

4.10. Analisis Data

Data yang diperoleh dari empat kelompok perlakuan dianalisis dengan Uji Kolmogorov Smirnov untuk mengetahui distribusi datanya. Hasil Analisis. distribusi datanya normal maka dilanjutkan dengan uji one way anova (post hoc test) dengan tingkat kemaknaan 0,05.

Semua uji statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS 7.5 for Window

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Respon alergi pada mencit dilihat berdasarkan parameter kadar IFN- γ dan hitung jenis eosinofil. Kadar IFN- γ dengan satuan kadar pg/ml, yang dihasilkan dari supernatan kultur sel limfosit yang diambil dari limpa mencit Balb/C. Setelah didapatkan supernatan dari kultur sel limpa ini, selanjutnya kadar sitokin IFN- γ diukur menggunakan ELISA reader. Parameter mikroskopis menggunakan pengecatan *Giemsa* dengan sampel berasal dari darah tepi mencit dimana hasilnya adalah hitung jenis eosinofil.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *The Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian. Dimana mencit dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing 6 ekor. Masing-masing kelompok diberi perlakuan yang berbeda. Perlakuan ini diberikan selama 4 minggu dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar IFN- γ dengan sampel yang diambil dari kultur sel limfosit dan hitung jenis eosinofil yang diambil dari darah vena mencit.

5.1. ANALISIS STATISTIK IFN- γ

5.1. 1 Analisis Deskriptif IFN- γ

Rerata kadar IFN- γ pada kelompok kontrol (K) 14,43 pg/ml, kelompok yang hanya diberi ovalbumin (P1) 5,77 pg/ml, rerata kadar IFN- γ kelompok yang diberi ovalbumin dan GTP 1,5 mg (P2) 7,23 pg/ml dan rerata kelompok yang diberi ovalbumin dan GTP 6mg (P3) 9,75 pg/ml.

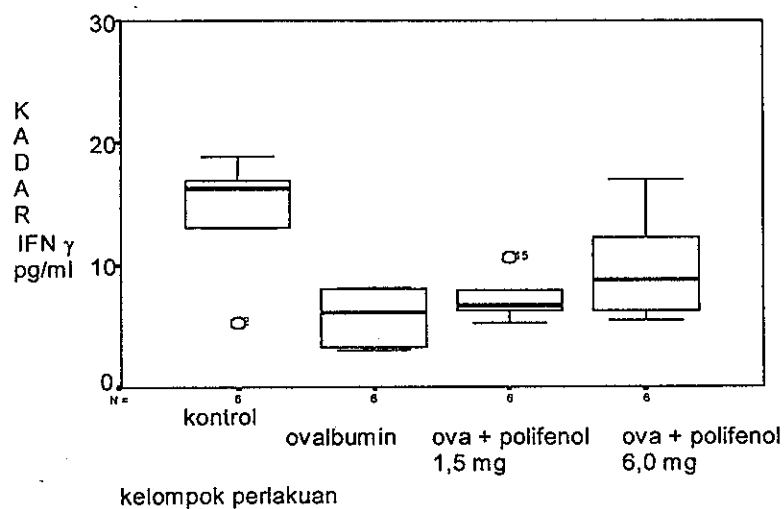
Tabel 2.

Analisis Deskriptif Kadar IFN- γ pada kelompok perlakuan

kelompok perlakuan	Rerata (pg/ml)	Simpang Baku	Minimum (pg/ml)	Maksimum (pg/ml)
Kontrol (K)	14,43	4,96	5,26	18,86
Ovalbumin (P1)	5,77	2,26	2,98	8,18
ova + polifenol 1,5 mg (P2)	7,23	1,88	5,23	10,60
ova + polifenol 6,0 mg (P3)	9,75	4,39	5,51	16,93

Rerata kadar IFN- γ pada kelompok yang hanya diberi ovalbumin (P1) 5,77 pg/ml jauh lebih rendah dibandingkan rerata kadar IFN- γ kelompok kontrol (K) 14,43 pg/ml. Didapatkan peningkatan kadar IFN- γ pada kelompok yang disensitisasi ovalbumin saja (P1) 5,77 pg/ml dibandingkan dengan kelompok yang diberi *GTP* 1,5 mg (P2) 7,23 pg/ml. Terjadi juga peningkatan pada kelompok yang diberi *GTP* 1,5 mg (P2) dibandingkan dengan kelompok yang diberi *GTP* 6 mg (P3) 9,75 pg/ml.

Median kadar IFN- γ pada kelompok kontrol (K) sangat berbeda dengan kelompok yang hanya diberi ovalbumin (P1), kelompok yang diberi ovalbumin + *GTP* 1,5 mg (P2) maupun kelompok ovalbumin + *GTP* 6,0 mg (P3). Sedangkan median kelompok ovalbumin (P1) hampir sama dengan kelompok ovalbumin + *GTP* 1,5 mg (P2), namun agak berbeda dengan kelompok ovalbumin + *GTP* 6,0 mg (P3).



Gambar 1. Grafik boxplot dari kadar IFN- γ pada tiap kelompok perlakuan

5.1.2. Analisis Analitik IFN- γ

Kadar IFN- γ yang diperoleh dari penelitian ini dilihat distribusi datanya dengan menggunakan uji Kolmogorov Smirnov dan didapatkan bahwa distribusi datanya normal. Uji analitik dilanjutkan dengan one way anova test dan didapatkan kemaknaan 0,03 ($p < 0,05$) sehingga didapatkan perbedaan yang bermakna dari keempat kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji beda makna antar kelompok dengan uji LSD.

TABEL 3.

Hasil uji LSD terhadap kadar IFN- γ dari empat kelompok perlakuan

Kelompok perlakuan	K	P1	P2	P3
K : Kontrol	-	<0,01	0,02*	0,04*
P1 : ovalbumin	<0,01	-	0,49	0,07*
P2 : Ovalbumin + GTP 1,5 mg	0,02*	0,49	-	0,24
P3 : Ovalbumin + GTP 6 mg	0,04*	0,07	0,24	-

Keterangan : * signifikan $p < 0,05$

Dari uji LSD didapatkan perbedaan sangat bermakna $p < 0,01$ pada kelompok yang hanya diberi ovalbumin saja (P1) dibandingkan dengan kelompok kontrol (K).

Pada kelompok yang hanya diberi ovalbumin saja (P1) dibandingkan dengan kelompok yang diberi ovalbumin + *GTP* 1,5 mg (P2) didapatkan $p = 0,49$ dan kelompok yang hanya diberi ovalbumin saja dibandingkan dengan kelompok yang diberi ovalbumin + *GTP* 6 mg (P3) didapatkan $p = 0,07$

Bisa dilihat bahwa kadar IFN- γ semua perlakuan berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol. Sehingga hasilnya adalah pemberian ovalbumin akan menurunkan kadar IFN- γ secara sangat bermakna $p < 0,00$. Kadar IFN- γ pada kelompok ovalbumin + *GTP* 1,5 mg (P2) tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok P1 yang hanya diberi ovalbumin saja ($p = 0,49$) seperti juga kadar IFN- γ pada kelompok ovalbumin + *GTP* 6 mg (P3) dibandingkan dengan kelompok yang hanya diberi ova (P1) menunjukkan perbedaan tidak bermakna ($p = 0,07$). Sedangkan pada kelompok (P3) pemberian *GTP* pada dosis 1,5 mg kadar IFN- γ tidak meningkat secara bermakna dibandingkan dengan kelompok (P3) yang diberi *GTP* dosis 6 mg dimana $p = 0,24$.

5.1.3. PEMBAHASAN IFN- γ

Pemberian ovalbumin bisa menurunkan kadar IFN- γ secara signifikan dilihat dari perbedaan antara kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3). Turunnya kadar IFN- γ merupakan hal yang menandai terjadinya proses alergi dengan kata lain respon imun telah bergeser ke arah Th2. Pada penelitian ini percobaan untuk

memanipulasi mencit agar memiliki suasana imun pro alergi sudah berhasil dengan didapatkannya penurunan kadar IFN- γ yang sangat bermakna.

Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Mosmann dkk. berupa penelitian terhadap *clone* sel T yang terbagi menjadi dua subset berdasarkan perbedaan produksi sitokin dan limfokinnya. Sel Th1 yang teraktivasi akan memproduksi IL-2, IFN- γ dan limfotoksin, akan tetapi tidak memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-10.³ Dengan demikian penelitian ini turut andil dalam membuktikan adanya keseimbangan respon imun Th1-Th2.

Ovalbumin sebagai bahan yang dapat merangsang pembentukan respon imun ke arah Th2 dominan dan merupakan salah satu alergen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya reaksi alergi tipe I pada manusia. Penelitian ini secara tidak langsung sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sugimoto dkk (1999) dimana ovalbumin mampu menimbulkan respon imun Th2.³⁶ Ovalbumin dapat diberikan secara inhalasi, oral maupun intra peritoneal, percobaan berhasil dilakukan juga oleh Kang B dan Akiyama.^{12,13}

Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna pada peningkatan kadar IFN- γ diantara kelompok perlakuan (P1,P2,P3) menunjukkan bahwa pemberian *GTP* tidak mampu meningkatkan kadar IFN- γ pada respon imun pro alergi. Penelitian yang dilakukan Matsunaga (2001) EGCg mampu meningkatkan produksi IFN- γ pada makrofag yang dipicu oleh *Legionella pneumophila* (respon imun terhadap infeksi).¹⁵ Namun pada penelitian ini (respon *GTP* terhadap alergi) peningkatan IFN- γ tidak sebaik pada respon imun terhadap infeksi disebabkan adanya IL-10 yang diproduksi

oleh sel limfosit Th2 kemungkinan mengakibatkan penekan sel limfosit Th1 untuk memproduksi IFN- γ sehingga kadarnya meningkat tidak bermakna.¹¹

Pengaruh *GTP* terhadap peningkatan kadar IFN- γ yang tidak bermakna pada penelitian ini belum bisa membuktikan bahwa *GTP* dapat menekan respon alergi seperti yang dilakukan oleh Shiozaki (1997). Pada penelitian Shiozaki komponen terbesar *GTP* yaitu EGCg secara signifikan dapat mencegah terjadinya reaksi alergi tipe I pada kulit yang diberi pemaparan sinar UV-B.⁹ Tachibana (2000) juga berhasil membuktikan bahwa EGCg mampu menghambat produksi histamin dengan jalan menghambat proses degranulasi basofil manusia.⁸ Penelitian ini belum bisa mencapai yang diharapkan seperti yang dilakukan oleh Shiozaki ataupun Tachibana, namun didapatkan adanya tendensi peningkatan kadar IFN- γ .^{8,9}

Apabila durasi pemberian *GTP* lebih lama barangkali akan terjadi perbedaan yang bermakna terhadap peningkatan kadar IFN- γ , karena pada penelitian yang dilakukan oleh Kang B (1999) membuktikan bahwa pemberian ovalbumin secara oral dengan dosis 2,5 – 250 mg pada tikus Balb/c selama 4 minggu menyebabkan terjadinya toleransi respon imun tikus bertahan ke arah Th2 dominan selama 26 minggu meskipun respon imun terhadap Th1 juga terbentuk.²² Sehingga respon imun Th2 bisa bertahan 5 kali masa pemaparannya, sedangkan IFN- γ tidak persisten dan mudah *break down*. Dapat disimpulkan diperlukan pemberian *GTP* lebih lama. Jadi jika menginginkan perbedaan yang signifikan barangkali diperlukan pemberian *GTP* selama sedikitnya 5 kali lamanya masa pemaparan.³⁷

Dimungkinkan pula penambahan dosis dari *GTP* karena penelitian yang dilakukan Gunawijaya (1996) menyebutkan bahwa LD-50 dari ekstrak teh hijau adalah

5,7-11,0 gr/kg BB. Mencit BALB/c dengan berat 20 g maka LD-50 dari ekstrak teh hijau ini setelah dosis dikonversi pada mencit adalah 114 – 220 mg perhari. Pada penelitian ini kami memberikan dosis optimum yaitu 1,5 mg dan 6,0 mg perhari. Kedua dosis tersebut masih bisa ditingkatkan dalam rangka meningkatkan kadar IFN- γ , dimana pada penelitian ini belum meningkat bermakna.¹⁸

Penelitian yang dilakukan Tomita (2002) terhadap *Tea pigments* (produk dari teh yang telah teroksidasi menunjukkan bahwa theaflavins sebagai zat aktif pada Tea pigments memiliki kapasitas menghambat NF- κ B (Nuclear factor- κ B) suatu faktor transkripsi yang terkait dengan sitokin-sitokin *pro-inflammatory* seperti IFN- γ . Dengan kata lain theaflavins memiliki efek imunosupresi terhadap produksi IFN- γ karena kemampuan theaflavins dalam menghambat NF- κ B.³⁹ Peningkatan kadar IFN- γ pada penelitian ini tidak bermakna kemungkinan karena dalam *GTP* yang kami gunakan mengandung theaflavins yang memiliki kemampuan menghambat sekresi IFN- γ .

5.2. ANALISIS STATISTIK HITUNG JENIS EOSINOFIL

5.2.1 Analisis Deskriptif Hitung Jenis Eosinofil

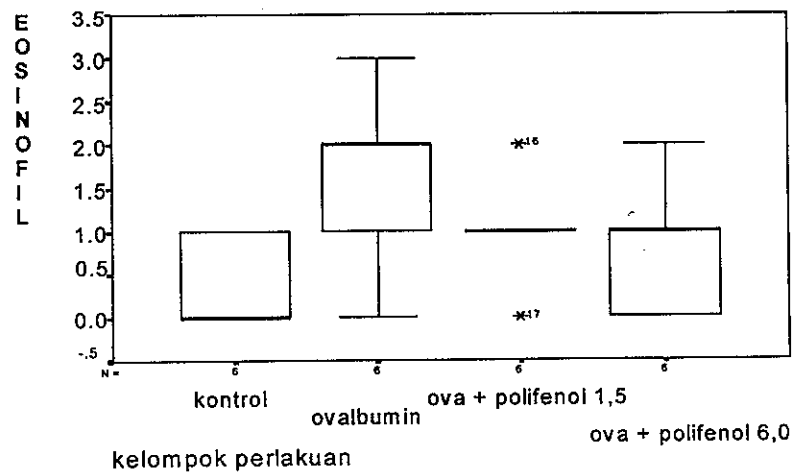
Rerata hitung jenis eosinofil pada kelompok kontrol (K) 0,33 eosinofil/ 100 lekosit, kelompok yang hanya diberi ovalbumin (P1) 1,67 eosinofil/ 100 lekosit , kelompok yang diberi ovalbumin dan *GTP* 1,5 mg (P2) 1 eosinofil/ 100 lekosit dan kelompok yang diberi ovalbumin dan *GTP* 6mg (P3) 0,83 eosinofil/ 100 lekosit.

Tabel 4.
Analisis Deskriptif Hitung Jenis Eosinofil darah tepi
pada kelompok perlakuan

kelompok perlakuan	Rerata (/100 lekosit)	Simpang baku (/100 lekosit)	Minimum (/100 lekosit)	Maksimum (/100 lekosit)
K : Kontrol	0,33	0,52	0	1,00
P1 : Ovalbumin	1,67	1,03	0	3,00
P2 : ova + <i>GTP</i> 1,5 mg	1,00	0,63	0	2,00
P3 : ova + <i>GTP</i> 6,0 mg	0,83	0,75	0	2,00

Rerata hitung jenis eosinofil pada kelompok kontrol (K) 0.33 /100 lekosit, lebih rendah jika dibandingkan dengan rerata dari kelompok yang hanya diberi ovalbumin 1,67/ 100 lekosit. Penurunan hitung jenis eosinofil pada kelompok yang disensitisasi ovalbumin dan diberi *GTP* 1,5 mg (P2) yaitu 1 /100 lekosit dibandingkan dengan kelompok yang hanya diberi ovalbumin (P1). Terjadi sedikit penurunan hitung jenis eosinofil pada kelompok yang disensitisasi ovalbumin dan diberi *GTP* 6 mg (P3) 0,83 /100 lekosit dibandingkan dengan rerata eosinofil pada kelompok yang diberi ovalbumin dan diberi *GTP* 1,5 mg (P2) 1/100 lekosit.

Pada hitung jenis eosinofil median kelompok kontrol (K) berbeda jauh dengan kelompok ovalbumin (P1) dan agak berbeda dengan kelompok ovalbumin + *GTP* 1,5 mg (P2), namun hampir sama dengan kelompok Ovalbumin + *GTP* 6,0 mg (P3). Sedangkan median kelompok ovalbumin (P1) agak berbeda dengan kelompok ovalbumin + *GTP* 1,5 mg (P2) , namun berbeda jauh dengan kelompok ovalbumin + *GTP* 6,0mg (P3).



Gambar 3. Grafik Boxplot hitung jenis eosinofil pada tiap kelompok perlakuan.

5.2.2 Analisis Analitik Hitung Jenis Eosinofil

Hitung jenis eosinofil yang diperoleh dilihat distribusi datanya dengan menggunakan uji Kolmogorov Smirnov dan didapatkan bahwa distribusi datanya normal.

Uji analitik dilanjutkan dengan one way anova test dan didapatkan kemaknaan 0,047 ($p < 0,05$), sehingga hasilnya adalah didapatkan perbedaan yang bermakna dari keempat kelompok perlakuan perlakuan. Dengan demikian dilakukan uji beda makna antar kelompok menggunakan uji LSD.

Tabel 5.
Hasil uji beda makna antar kelompok (Uji LSD)
pada hitung jenis eosinofil darah tepi

Kelompok perlakuan	K	P1	P2	P3
K : kontrol	-	0,06*	0,14	0,27
P1 :Ovalbumin	0,06*	-	0,14	0,07*
P2 : Ovalbumin + <i>GTP</i> 1,5 mg	0,14	0,14	-	0,71
P3 : Ovalbumin + <i>GTP</i> 6 mg	0,27	0,07*	0,71	-

Dari hasil uji beda makna antar kelompok dengan menggunakan uji LSD didapatkan bahwa hitung jenis eosinofil tidak berbeda bermakna $p=0,06$ pada kelompok kontrol (K) dibandingkan dengan kelompok yang hanya diberi dengan ovalbumin (P1). Uji beda antara kelompok yang hanya diberi Ovalbumin (P1) dengan kelompok yang disensitisasi ovalbumin dan diberi *GTP* 1,5 mg (P2) berbeda tidak bermakna $p=0,14$. Uji beda antara kelompok kontrol dengan kelompok yang disensitisasi ovalbumin dan diberi *GTP* 6 mg (P3) berbeda tidak bermakna $p=0,07$. Uji beda antara kelompok yang diberi ovalbumin dan *GTP* 1,5 mg (P2) dengan kelompok yang diberi ovalbumin dan *GTP* 6,0 mg (P3) tidak berbeda bermakna $p=0,71$.

5.2.4. PEMBAHASAN HITUNG JENIS EOSINOFIL

Pada penelitian ini tidak didapatkan perbedaan yang bermakna rerata hitung jenis eosinofil kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan (P1, P2,

P3), hal tersebut membuktikan bahwa pemberian OVA berpengaruh terhadap jumlah eosinofil darah perifer mencit BALB/c.

Pemberian ovalbumin secara intra peritoneal tidak mengakibatkan eosinofilia seperti yang diharapkan yaitu berjumlah >5 eosinofil/100 lekosit. Pemberian ovalbumin tidak meningkatkan hitung jenis eosinofil darah tepi secara bermakna $p=0,06$ dilihat dari perbandingan antara kelompok yang diberi ovalbumin(P1) dibandingkan dengan kelompok kontrol (2).

Penelitian yang dilakukan oleh Erb (1998) Efek BCG terhadap respon Th2 karena pemberian ovalbumin, menunjukkan bahwa pada pemberian BCG intra nasal hanya menekan respon imun lokal yaitu intra nasal dan tidak mempengaruhi eosinofilia pada darah.³⁴ Penelitian yang dilakukan penulis pemberian *GTP* dilakukan secara per oral dimana efek sistemik sangat mungkin terjadi, namun kenapa penurunan jumlah eosinofilia darah tidak terlalu terpengaruh mungkin karena *challenge* ovalbumin dilakukan secara intra peritoneal, maka sebaran eosinofil kemungkinan lebih banyak di daerah yang langsung terpapar ovalbumin (intra peritoneal).³⁴

Hitung jenis eosinofil darah tepi ini tidak terlalu terpengaruh oleh pemberian *GTP* pada mencit yang pro alergi akibat peranan IL-10 yang diproduksi. Sensitisasi ovalbumin mengakibatkan penekanan produksi sitokin Th1 mengakibatkan kadar IFN- γ yang terbentuk kurang *adequate* dalam mensupresi sitokin Th2 (IL-5, IL-13) yang mengakibatkan penurunan jumlah eosinofil tidak bermakna.³⁸ IL-5 dan IL-13 adalah sitokin yang terkait dengan pematangan eosinofil dan menstimulasi produksi IgE.

Sitokin-sitokin tersebut diatas sangat terkait pula dengan umur eosinofil yang rata-rata berumur 26 hari.³⁸ Perlakuan terhadap hewan coba sejak pemaparan

ovalbumin dan pemberian *GTP* sampai pemeriksaan hitung jenis eosinofil memakan waktu 28 hari, dengan demikian diperlukan pemberian suplementasi *GTP* lebih lama untuk menekan sitokin-sitokin Th2 agar tidak memperpanjang survival dari eosinofil

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

5.1. SIMPULAN

1. Pemberian ovalbumin menyebabkan respon imun bergeser ke respon imun pro alergi (Th2) dilihat dari rerata kadar IFN- γ pada kelompok yang hanya diberi ovalbumin (5.77 pg/ml) jauh lebih rendah dibandingkan rerata kadar IFN- γ kelompok kontrol (14.43 pg/ml) secara statistik bermakna ($p < 0,01$).
2. Pemberian *GTP* bertendensi meningkatkan kadar IFN- γ namun peningkatannya tidak bermakna dilihat dari rerata kadar IFN- γ kelompok yang hanya diberi ovalbumin hanya 5,77 pg/ml meningkat menjadi 7,23 pg/ml pada kelompok yang diberi ovalbumin + *GTP* 1,5 mg dan meningkat lagi menjadi 9.75 pg/ml pada kelompok yang diberi ovalbumin + *GTP* 6 mg, namun dari uji kemaknaan perbedaanya tidak bermakna ($p > 0,05$).
3. Pemberian ovalbumin memiliki potensi meningkatkan hitung jenis eosinofil dilihat dari rerata hitung jenis eosinofil kelompok yang hanya diberi ovalbumin (1,67 eosinofil/100 lekosit) dibandingkan dengan kelompok kontrol (0,33 eosinofil/100 lekosit) dengan ($p = 0,06$).
4. Ada kecenderungan pemberian *GTP* dapat menurunkan hitung jenis eosinofil, dilihat dari rerata jumlah eosinofil pada kelompok yang hanya diberi ovalbumin (1,67 eosinofil/ 100 lekosit) sedangkan pada kelompok yang yang diberi ovalbumin+ *GTP* 1,5 mg (1 eosinofil/100 lekosit) dan kelompok yang diberi ovalbumin + *GTP* 6 mg (0,83 eosinofil/100 lekosit), namun dengan perhitungan statistik penurunan ini tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$).

5.2. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh *GTP* terhadap alergi dengan memperpanjang durasi pemberian suplementasi *GTP* dan meningkatkan dosis *GTP*.
2. Perlu dilakukan penelitian melihat perbedaan klinis alergi yang bisa dilakukan dengan pemeriksaan menggunakan pemeparan ovalbumin melalui saluran pernafasan kemudian dinilai dengan pemeriksaan Patolologi Anatomi pada area yang terpapar.
3. Perlu melakukan penelitian lanjutan menggunakan indikator-indikator alergi yang lain misalnya kadar IL-4, skin test pada telinga mencit, pemeriksaan kadar IgE mencit dan pemeriksaan sebulan mastosit pada jaringan yang terpapar ovalbumin.
4. Pada aplikasi kehidupan sehari-hari perlu dianjurkan agar mengurangi pola hidup yang terlalu steril karena adanya paparan infeksi ternyata memiliki sisi keuntungan dimana prevalensi alergi dapat diturunkan.

BAB VII

RINGKASAN

Prevalensi dari penyakit atopi di negara berkembang secara umum lebih rendah dibandingkan dengan negara maju. Di negara maju jumlah penyakit atopi justru meningkat pesat, hal ini terjadi karena sanitasi yang lebih baik mengakibatkan paparan infeksi menjadi lebih jarang. Terkait dengan paradigma keseimbangan Th1-Th2, dimana pada aplikasinya pemberian terapi yang merangsang respon imun ke arah yang salah, bisa mengakibatkan suatu penyakit menjadi lebih parah bahkan bisa menimbulkan kematian dan hal ini merupakan tantangan bagaimana membuat suatu respon imun yang tepat dalam mengatasi alergi.

Penelitian ini dilakukan dalam rangka menggeser respon imun pro alergi menjadi respon imun selular dilakukan dengan cara pemberian suplementasi polifenol teh hijau (*Green Tea Poliphenol / GTP*) yang diharapkan mampu meningkatkan kadar IFN- γ dan menurunkan hitung jenis eosinofil darah tepi pada mencit yang disensitisasi ovalbumin.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian *GTP* bisa meningkatkan kadar IFN- γ namun peningkatannya tidak bermakna, sedangkan pemberian ovalbumin mengakibatkan kadar IFN- γ turun secara bermakna. Hal tersebut membuktikan bahwa ovalbumin memang mampu menggeser respon imun ke arah Th2 (pro alergi). Hitung jenis eosinofil darah tepi tidak terpengaruh oleh sensitisasi ovalbumin, namun pemberian suplementasi *GTP* walaupun dapat menurunkan hitung jenis eosinofil darah tepi namun penurunannya tidak bermakna.

Kemampuan polifenol teh hijau dalam menurunkan alergi ternyata tidak sebaik kemampuannya dalam mengatasi infeksi intra selular dan tumor karena efek pemberian polifenol teh hijau telah teroksidasi memiliki tea pigments yang bekerja menghambat NF- κ B, dimana memiliki aktivitas menghambat pembentukan IFN- γ . Penelitian diatas menunjukkan bahwa pemberian ovalbumin yang menghasilkan sitokin Th2 seperti IL-10 bisa mengakibatkan penekanan terhadap Th1 untuk memproduksi IFN- γ .

Pemberian *GTP* masih potensial menurunkan respon alergi jika pemberiannya dalam jangka waktu lebih panjang dan dosis yang lebih besar. *GTP* tidak menimbulkan supresi sistem imun secara global jika dibanding imunosupresan dalam mengatasi alergi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Holgate ST, Church MK. *Allergy*. 2nd ed. London. Mosby International 2001 : 3-16
2. Biggelaar AH, Ree RV, Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *The Lancet* 2000; 356: 1723-27
3. Constant SL , Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T Cell Response: The alternative approach. *Annu. Rev. Immunol.* 1997. 15:297-322.
4. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et all. Two types murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokin activities and secreted protein. *J. Immunology* 1986, 138 : 3688-94
5. Oriss T B, McCarthy S A, Campana M A , Morel P A. Evidence of Positive Cross-Regulation on Th1 by Th2 and Antigen-Presenting Cells: Effects on Th1 Induced by IL-4 and IL-12 . *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 1999-2007
6. Katiyar, S., A. Challa, T. S. 1999. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate may be associated with alternations in IL-10 and IL-12 production. *Carcinogenesis*. 20:2117 – 24
7. Wang ZY, Agarwal R, Bickers DR, Mukhtar H. Protection againts ultraviolet B radiation induced photocarcinogenesis in hairless mice by green tea polyphenols. *Carcinogenesis* 1991 Aug; 12 (8) : 1527-30
8. Tachibana H., Sunada Y. Identification of methylated tea catechin as an inhibitor of degranulation in human basophilic KU812 cells. *J. Biosci Biotechnol Biochem* 2000 Feb; 64(2) : 452-4

9. Shiozaki T., Sugiyama K.. Effect of tea extract, catechin, and caffeine against type-I allergic reaction. . *Yakugaku Zasshi*. 1997 Jul ; 112(7) : 448-54
10. Indrawati, Hematologi Rutin, Buku Pegangan Kuliah Patologi Klinik I Jilid I, FK Undip, 2000 ; 13
11. Matsunaga K., Klein T. W. Legionelle pneumophila replication in macrophages inhibited by selective immunomodulatory effects on cytokine formation by epigallocatechin gallate, a major form of tea catechin. . *J. Infection & immunity* 2001, 69 : 3947- 53
12. Kang B., Kim KM., Kang CY. Oral tolerance by high dose OVA in Balb/ c mice is more pronounced and persistent in th2-mediated immune responses than Th1 responses. *J. Immunobiology* 1999, 200 : 264 – 76
13. Akiyama H., Teshima R., Sakushima JI. Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains mice. *Immunol Lett* 2001 Aug 1;78(1):1 – 5
14. Terui T, Sano K, Okada M, Production and Pharmacologic Modulation of the Granulocyte-Associated Allergic Responses to Ovalbumin in Murine Skin Models Induced by Injecting Ovalbumin-Specific Th1 or Th2 Cells. The society for Investigative Dermatology, Inc 2001, 236-43.
15. Galli S.J., Lantz C.S. Allergy. In : Paul W.E. *Fundamental immunology*. 4th eds. New York. Lippincott-Raven.1999 :1151 – 55
16. Romagnani S. The Th2/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997 ; 18 : 263 –266

17. Chow HH, et al. Phase I Pharmacokinetic Study of Tea Polyphenols Following Single-dose Administration of EGCG and Polyphenon E. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Jan;10(1):53-8.
18. Gunawijaya FA, Penentuan LD-50 Ekstrak Teh Hijau pada Mencit Strain C3H, *Majalah Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti* 1996, 15 : 4-6
19. Johan A, Susilaningih N, Gunardi. Penelitian in vitro Efek Polifenol Teh Hijau terhadap Mekanisme Pertahanan Tubuh pada Mencit yang Diinokulasi *L. Monocytogenes*. *Laporan Akhir Penelitian DCRG Proyek URGE 2000/2001*, 10-1
20. Bowman L.M., Holt P.G. Selective Enhancement of systemic Th1 immunity in immunologically immature rats with an orally administered bacterial Extract. *J. infection and Immunity*, June 2001 : 3719 – 27.
21. Sakagami, H., M. Takeda. 1995. Stimulation by epigallocatechin gallate of interleukin 1 production by human peripheral blood mononuclear cell. *Anticancer Res.* 15:971-74.
22. Ewan P W. ABC of allergies : Anaphylaxis. *BMJ* 1998;316:1442-1445
23. Delves P J, Roitt I M. The Immune System— First of Two Parts. *English Journal of Allergy.* 2000 ; 343:37-49
24. Gienbycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the Eosinophil. *pharmrev. aspet journals.* June 1999 Vol. 51, Issue 2, 213-340
25. Howarth P H. ABC of allergies : Pathogenic mechanisms a rational basis for treatment. *BMJ* 1998;316, 758
26. Cohn L. Food for Thought : Can Immunological Tolerance Be Induced to Treat Asthma? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, Volume 24, Number 5, May 2001 509-12

27. Weiner HL. Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J Clin Invest*, October 2000, Volume 106, Number 8, 935-7
28. Stumbles A, Thomas JA, Pimm CL. Resting Respiratory Tract Dendritic Cells Preferentially Stimulate T Helper Cell Type 2 (Th2) Responses and Require Obligatory Cytokine Signals for Induction of Th1 Immunity. *J. Exp. Med.*, Volume 188, Number 11, December 7, 1998 2019-31
29. Morokata T., Ishikawa J., Yamada T. Antigen dose defines T helper 1 and T helper 2 responses in the lungs of C57BL/6 and BALB/c mice independently of splenic responses. *Immunol Lett* 2000 May, 72 (2) : 119 – 26
30. Saloga J., Reinz H., Lack G. Development and transfer of immediate cutaneous hypersensitivity in mice exposed to aerosolized antigen. *J. Clin. Invest.* 1993 , 91:133 – 40
31. Saloga J., Reinz H., Larsen GL. Increased airways responsiveness in mice depend on local challenge with antigen. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994. 149:65 – 70.
32. Stewart J, Weir M. *Immunity in Viral Infections*. In: Medical Microbiology, 14th ed. Edited by Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF. London: Churchill Livingstone.,1992
33. Clancy J. *Basic Concepts in Immunology*. A Student 's survival guide. McGraw-Hill. 1988: 10-11
34. Erb K J, Holloway J W, Sobeck A. Infection of Mice with Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Suppresses Allergen-induced Airway Eosinophilia . *J. Exp. Med.*, 1998 187: 561-9.

35. Oris TB, McCarthy SA, Campana M A, Morel PA. Evidence of Positive Cross Regulation on Th1 by Th2 and Antigen-Presenting Cells: Effects on Th1 Induced by IL-4 dan IL-12. *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 1999-2007.
36. Sugimoto Y., Sanuki S. 1999. Ovalbumin in developing Chiken eggs migrates from egg white to embryonic organs while Changing its conformation and thermal stability. *J Biol Chem.*16: 11030-37
37. Yap G, Pesin M. IL-12 Is Required for the Maintenance of IFN-g Production in T Cells Mediating Chronic Resistance to the Intracellular Pathogen, *Toxoplasma gondii* . *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 628-631.
38. Katiyar SK, Bergamo BM, Vyalil PK, Elmets CA. Green tea polyphenols : DNA photodamage and photoimmunology. *J. Photochem Photobiol B* 2001 Dec 31; 65 (2-3) : 109 –14
39. Tomita M, Irwin KI, Tea Pigments Inhibit the Production of Type 1 (Th1) dan Type 2 (th2) helper T Cells Cytokines.